HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	モノクローナル抗体による補体第一成分C1の亜成分C1sの機能ドメインの解析
Author(s)	松本, 美佐子
Degree Grantor	Osaka University
Degree Name	博士(薬学)
Issue Date	1990-02-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/32901
Type	doctoral thesis
File Information	matsumoto.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

モノクローナル抗体による補体第一成分Ｃ１の亜成分Ｃ1̄sの機能ドメインの解析

松 本 美 佐 子

略語表

C1-INA	C1 inactivator
C4 bp	C4 binding protein
CR1	C3b/C4b receptor
CR2	C3d/EBV receptor
CR3	iC3b receptor
CR4	P150/95
MCP	membrane cofactor protein of complement
DAF	decay accelerating factor
HRF	homologous restriction factor
C8 bp	C8 binding protein
MAC	membrane attack complex
MAb	monoclonal antibody
ELISA	enzyme linked immunosolvent assay
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
SDS	sodium dodecyl sulfate
BSA	bovine serum albumin
HRP	horseradish peroxidase
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
AAME	N-acetyl-L-arginine methyl ester hydrochloride
ALME	N-acetyl-L-lysine methyl ester hydrochloride
TAME	P-tosyl-L-arginine methyl ester hydrochloride
ATEE	N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester hydrochloride
SCR	short consensus repeat
p-APMSF	(p-amidinophenyl)methanesulfonyl fluoride hydrochloride
EA	antibody sensitized sheep erythrocyte
IAA	iodoacetamide
TTHA	triethylenetetramine-hexaacetic acid
PEG	polyethylene glycol
FCS	fetal calf serum
2ME	2-mercaptoethanol
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

目次

緒論 -1-

本論

第一章 モノクローナル抗体による $C\bar{1}s$ の機能解析 -5-
第一節 $C\bar{1}s$ に対するモノクローナル抗体の特徴 -6-
第二節 $C\bar{1}s$ の酵素活性に及ぼすモノクローナル抗体の影響 -13-
第三節 C1 INA-$C\bar{1}s$ 複合体形成におけるモノクローナル抗体の影響 -16-
第四節 要約ならびに考察 -18-

第二章 $C\bar{1}s$ の C4 結合ドメインの同定 -22-
第一節 $C\bar{1}s$ の C4 結合ドメインの同定 -24-
第二節 $C\bar{1}s$ の糖鎖構造 -29-
第三節 $C\bar{1}s$ の SCRs ドメインへの C4/C4b の結合 -31-
第四節 要約ならびに考察 -35-

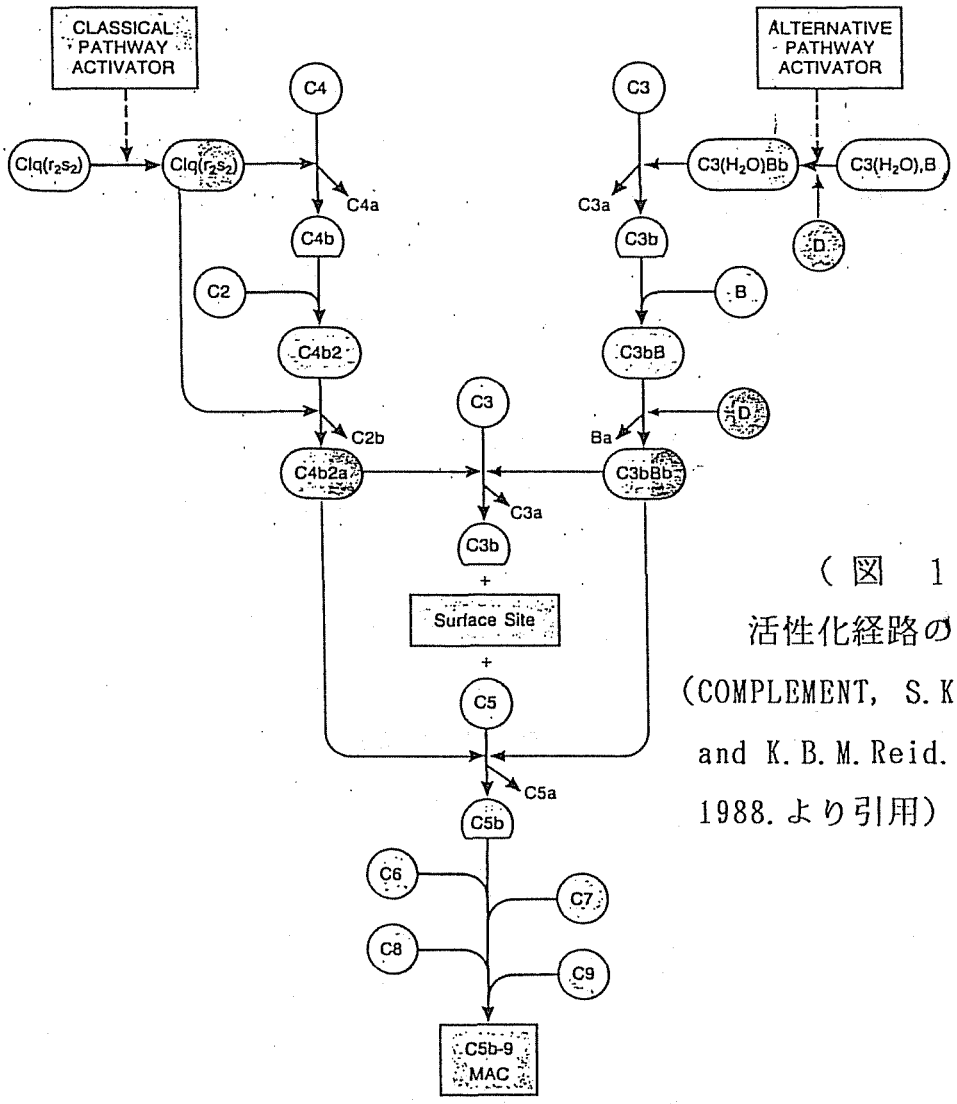
第三章 免疫複合体と C1 の相互作用における モノクローナル抗体 の影響 -38-
第一節 モノクローナル抗体 M365 による免疫複合体からの $C\bar{1}$ の遊離 -38-
第二節 C1 と免疫複合体の結合に対する M365 の影響 -43-
第三節 要約ならびに考察 -45-

結論 -47-
謝辞 -48-
実験の部 -49-
引用文献 -71-

緒論

1890 年代に血清中に存在する易熱性の殺菌因子として発見された補体は、その後研究が進むにつれて、単一の蛋白質ではなく約 30 種類もの蛋白質群から構成され、生体内での異物排除ならびに種々の免疫反応に関与していることが明らかとなってきた。故に補体系蛋白とは、補体系が活性化された時一連の反応に直接的に関わる 13 種類の補体成分（C1q, C1r, C1s, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8, C9, B, D）と、補体活性化を調節する 6 種類の血漿蛋白質（C1-INA, C4bp, H, I, P, S-protein）、及び 11 種類の膜蛋白質、すなわち活性化された補体成分フラグメントに対するレセプター（CR1, CR2, CR3, CR4, C3a/C4a receptor, C5a receptor, C1q receptor）あるいは膜結合制御蛋白質（CR1, MCP, DAF, HRF/C8bp, P18）をさす。

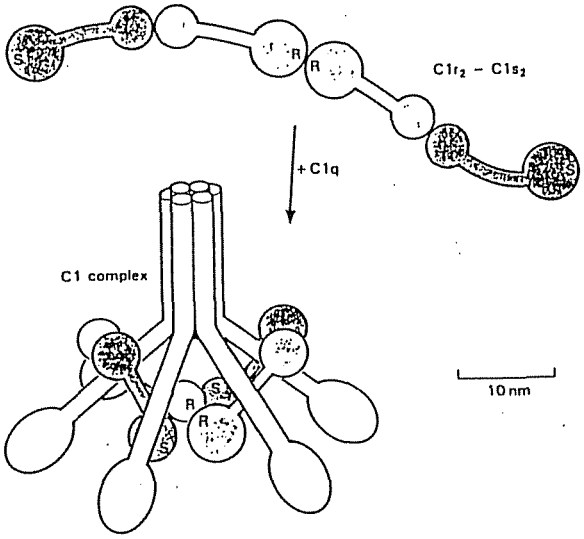
補体系の活性化経路には、主に免疫複合体による C1 の活性化から始まる classical pathway と、抗体を介さずに異物表面上で直接 C3 より活性化の進む alternative pathway の二経路が存在する（図 1）。両経路は全く別々に働くのではなく互いに関連し活性化の増幅が生じるとされている。 補体系の反応の主な特徴は、C5 分解に至るまでの一連の酵素による限定分解反応と、membrane attack complex（MAC）と呼ばれる膜障害性の C5b－9 複合体の形成に至る酵素反応を含まない分子集合反応である。限定分解反応に伴って生じる低分子の C3a、C4a、C5a は平滑筋収縮や血管透過性の亢進を生じさせ、C5a は食細胞の動員を起こす[1-3]。また C2b のプラスミン分解フラグメントにキニン様活性が見いだされ[4]、これら低分子フラグメントが炎症の成立に関与していると考えられている。



（図　1）
活性化経路の概要
（COMPLEMENT, S. K. A. Law, and K. B. M. Reid. IRL Press. 1988. より引用）

一方、C4b, C3b フラグメントは 補体系の活性化物質に共有結合で結合する。 活性化物質が細胞の場合、膜上で C3 コンベルターゼ (C4b2a, C3bBb)、さらに C5 コンベルターゼ(C4b2a3b, C3bBb3b) が形成され、MAC による細胞の損傷あるいは溶解が生じる。また活性化物質に結合した C3b, C4b フラグメントは好中球、マクロファージ、

赤血球上に存在する種々の C3 レセプターを介しての異物排除を媒介する。従って、補体の生物学的役割を考える時、最も重要な反応段階は C3/C5 コンベルターゼの形成であろうと思われる。古典的経路での C3 コンベルターゼの形成は生体内では主として C1 複合体と免疫複合体の相互作用によって引き起こされる。C1 複合体は図 2 に示すように C1q 1 分子と C1r、C1s 各々 2 分子から構成されている[5]。



（図 2）
C1 複合体の構造[5]

C1q 分子は 18 本のポリペプチド鎖からなり、6 個の腕のまわりで $C1r_2$ー$C1s_2$ 四量体と相互作用していると考えられている[6-9]。C1 複合体内で C1q 分子自体は酵素活性を持たず、免疫グロブリンの認識と結合に関与し、その結果 セリンエステラーゼ前駆体である C1r の自己活性化を生じさせる。活性型 $\overline{C1r}$ が やはりセリンエステラーゼ前駆体である C1s を $\overline{C1s}$ へと限定分解することにより最終的に活性型 $\overline{C1}$ が生じる。古典的経路 での C3 コンベルターゼの形成には、この C1 複合体内の C1s が $\overline{C1s}$ に活性化されることが必須条件である。活性化された $\overline{C1s}$ は基質である C4 と C2 を限定分解すること

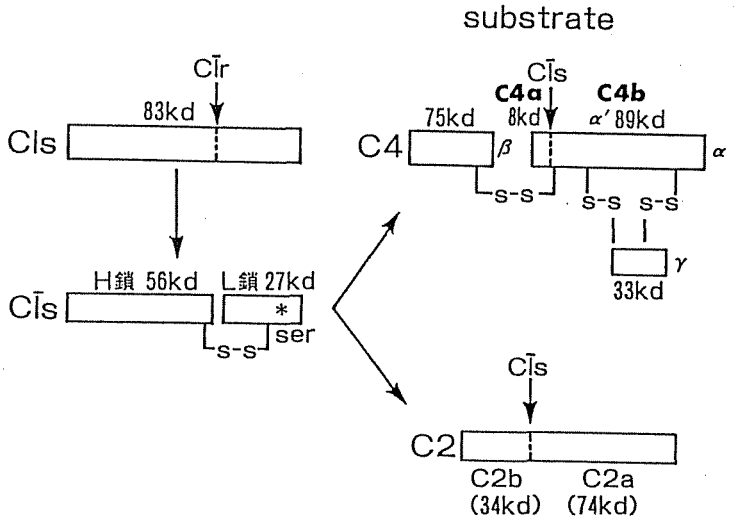
によって 2 分子複合体の C3 コンベルターゼ C4b2a を形成する。

著者は、古典的経路における最も重要な酵素である $C\bar{1}s$ の反応機構を明らかにする目的で $C\bar{1}s$ に対するモノクローナル抗体（MAb）を作製し、種々の解析を行った。本論文では（1）モノクローナル抗体による $C\bar{1}s$ の機能解析、（2）$C\bar{1}s$ の C4 結合ドメインの同定、（3）C1 複合体と免疫複合体との相互作用への C1s の関与に関する研究の結果について述べる。

本論

第一章　モノクローナル抗体による $\overline{C1s}$ の機能解析[10]

C1s は補体第一成分 C1 の亜成分として 50 μg/mlの濃度で血漿中に存在する糖蛋白質である。プロ酵素型の C1s は分子量約 83 kd の一本鎖ポリペプチドであるが、$\overline{C1r}$ により Arg－Ile 結合が切断されると分子量 56 kd の H 鎖と分子量 27 kd の L 鎖が S-S 結合で架橋された二本鎖ポリペプチド構造をとり活性型 $\overline{C1s}$ となる[11](図 3)。



(図 3)
$\overline{C1s}$ と $\overline{C1s}$ の基質
(C4, C2) の構造

$\overline{C1s}$ はセリンプロテアーゼで、L鎖のアミノ酸一次配列は他のセリンプロテアーゼ（トリプシン、プラスミン、カリクレイン、トロンビンなど）と相同性が高く、セリンプロテアーゼ特有の活性残基である His-57、Asp-102、Ser-195（キモトリプシン番号）が L 鎖内に保持されていることが示されている[12]。$\overline{C1s}$ の基質特異性は高く、補体第 4 成分 C4 の α鎖の N 末端側から分子量 8,000 の位置の Arg-Ala

結合を切断し C4 を C4a と C4b に分断する。またもう一つの基質である補体第 2 成分 C2 の N 末端側から分子量 34,000 の位置のArg-Lys 結合を切断し C2b と C2a を生じさせる(図 3)。しかし、$\overline{C1s}$ 上の同一の活性部位が C4 及び C2 の限定分解反応に関与するのか、あるいは異なる活性部位によって限定分解されるのかは不明である。

1975 年に Köher と Milstein[13]によって考案された抗体産生細胞とミエローマ細胞の融合によるモノクローナル抗体産性理論と技術は、特定の抗原決定基とのみ反応する抗体を得ることを可能にし蛋白質の機能解析を行う上で有用な手段であると思われた。著者は $\overline{C1s}$ の構造と機能の関連を明らかにするため、$\overline{C1s}$ を精製し、それに対するモノクローナル抗体を作製した。

本章では、(1)モノクローナル抗体の特徴、(2) $\overline{C1s}$ の酵素活性に及ぼすモノクローナル抗体の影響、及び (3) C1-INA による $\overline{C1s}$ の阻害に及ぼすモノクローナル抗体の影響について述べる。

第一節　$\overline{C1s}$ に対するモノクローナル抗体の特徴

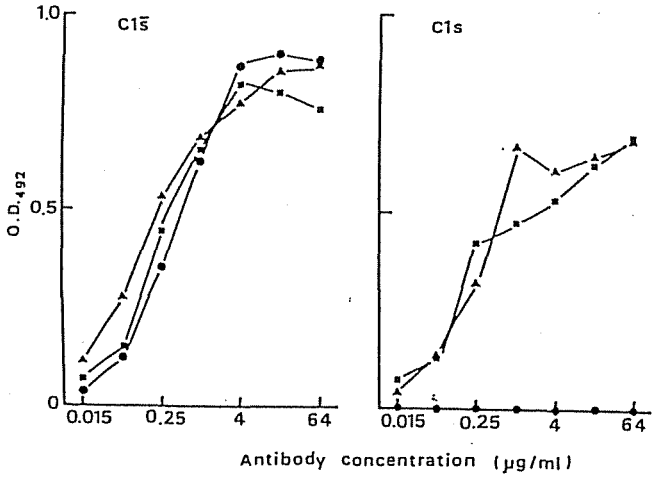
(1) MAb の作製及び抗原への結合活性

$\overline{C1s}$ に対する MAb は、高純度に精製したヒト $\overline{C1s}$ を (BALB/c X C57BL/6) F1 マウスに免疫し、その脾細胞を BALB/c 由来のミエローマ細胞 NS-1 細胞 とポリエチレングリコール法により融合して得た。培養細胞上清中の抗体活性は ELISA 法でスクリーニングし陽性クローンのみを選んだ後、更に $\overline{C1s}$ による C4, C2 分解活性を阻止するクローンをマイクロプレートによる溶血反応の阻止で選択した。陽性クローンはサブクローニングし、得られた細胞をマウスの腹腔内に注

射して腹水を採取した。抗体は硫安沈澱後 DEAE-Sephacel カラムを用いて精製した。得られた MAb は表1に示す通りである。抗体のサブクラスは抗マウスサブクラス抗体を用いてオクタロニー法で決定した。スクリーニングの段階で $C\bar{1}s$ の酵素活性を阻害しうる MAb として得られたものはM365, M81, 及び M241 の 3 クローンであった。

表 1

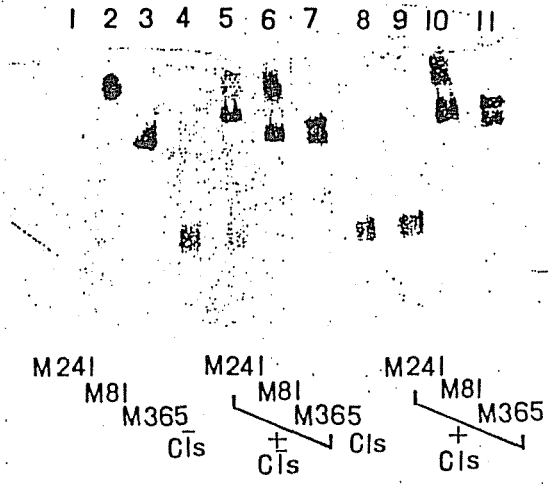
MAb	Subclass	MAb の結合 $C\bar{1}s$ subunit
M365	γ_1, κ	H 鎖
M81	γ_1, κ	H
M20	γ_1, κ	H
M80	γ_1, κ	H
M9	γ_1, κ	L
M241	γ_2b, κ	L
M36	γ_2b, κ	H
M86	γ_2b, κ	L



(図 4) MAbの$C\bar{1}s$及びC1sへの結合(ELISA)

精製$C\bar{1}s$あるいはC1sを固定したマイクロプレートの各ウェルに横軸に示した濃度のMAb(▲ M365、■ M81、 ● M241) を加えて室温で60分間反応させた。HRP結合抗マウスIgG と基質とを加えて発色させ、492nmの吸光度を測定しMAbの結合活性を調べた。

活性型 C1s ($C\bar{1}s$) とプロ酵素型 C1s (C1s) への結合を ELISA 法で調べると、M365, M81 は両者いずれにも結合するが M241 は $C\bar{1}s$ にのみ結合した (図 4)。すなわち M241 は一本鎖構造の C1s が切断をうけて二本鎖構造の $C\bar{1}s$ に構造変化を起こした時に新しく生じるコンフォメーションを認識していることを示している。更に、溶液中における $C\bar{1}s$ あるいは C1s と各 MAb の結合の有無を SDS を含まない PAGE で確認した。図 5 (lane 5, 9) に示すように、溶液中においても M241 は C1s には結合せず $C\bar{1}s$ にのみ結合した。M81, M365 は C1s, $C\bar{1}s$ いずれにも結合した。

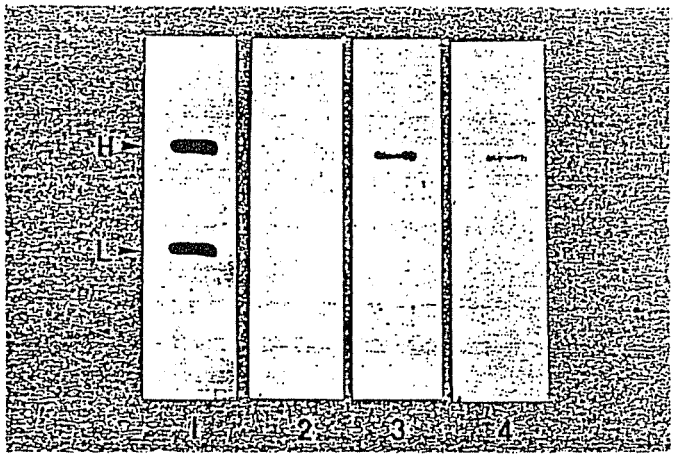


(図 5) 溶液中でのMAbの$C\bar{1}s$及びC1sへの結合 (5% ゲル)
MAb (10μg) と $C\bar{1}s$ あるいは C1s (10μg) を室温で20分間、更に4℃で一晩反応させた後、SDS を含まない5%ゲルに添加した。

(2) MAb の認識するエピトープの位置

MAb の認識するエピトープが H 鎖、L 鎖いずれに存在するかを明らかにする為、$C\bar{1}s$ を還元し SDS-PAGE を行い Towbin[14]の方法に基づきニトロセルロース膜へ転写した。ニトロセルロース膜は非特異

的な結合を防ぐ為 3% BSA-PB 中で 37℃, 1 時間反応させた後各 MAb と反応させた。膜をよく洗浄後、horseradish peroxidase (HRP) 結合抗マウスIgG と反応させて、HRP の基質である 4-クロロ-1-ナフトールを用いて発色させた。図 6 に示すように、M365 と M81 は $C\bar{1}s$ の H 鎖上のエピトープを認識することが明らかとなったが、M241 は H 鎖、L 鎖いずれとも反応しなかった。このことは、M241の認識するエピトープが $C\bar{1}s$ を還元することによって消失したことを意味する。すなわち M241 は $C\bar{1}s$ の一次構造ではなく三次構造を認識している可能性を示している。



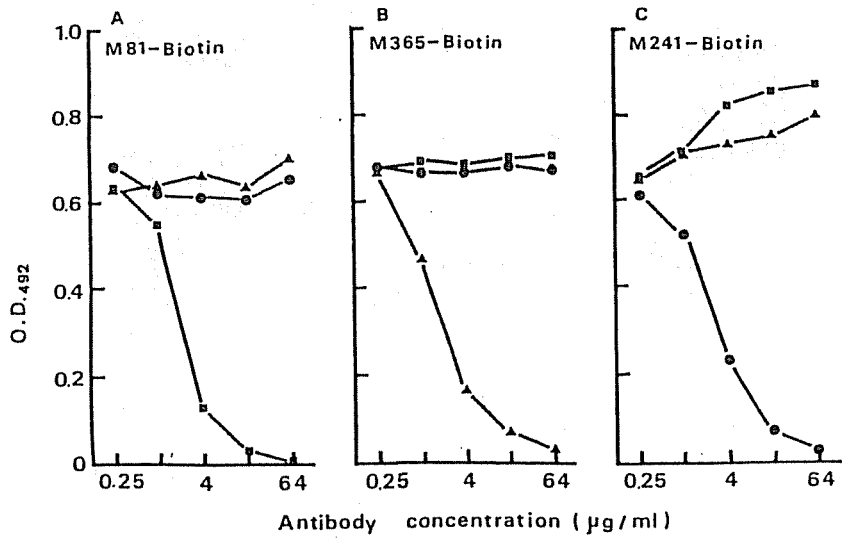
(図 6) MAb の還元 $C\bar{1}s$ への結合 (Immuno-blotting)

$C\bar{1}s$を還元し、SDS-PAGE (10%ゲル) 後、ニトロセルロース膜へ転写しMAbと反応させた。
lane 1, $C\bar{1}s$ のアミドブラック染色 ; lane 2, M241; lane 3, M81; lane 4, M365; H, $C\bar{1}s$ の H 鎖 ; L, $C\bar{1}s$ の L 鎖.

(3) 各 MAb のエピトープの異同

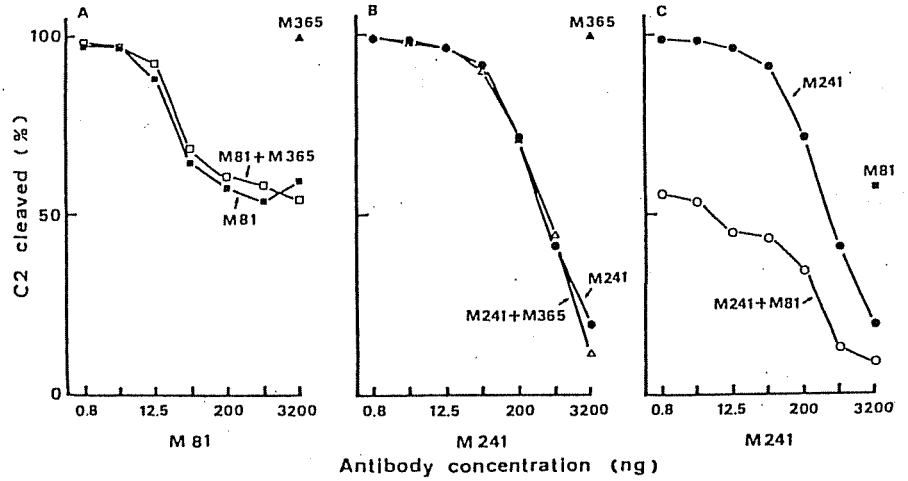
酵素活性を阻害するこれら MAbs の認識するエピトープの異同を調べる為、各々の MAb をビオチンで標識し未標識抗体による結合阻止実験を ELISA 法でおこなった。

図 7 に示すように、ビオチン標識 MAb の $C\bar{1}s$ への結合は同一の未標識 MAb で阻止されたが、他の 2 種の MAb では影響を受けなかった。更に固相上での結合のみならず溶液中においても各 MAb の $C\bar{1}s$ への結合が競合しないことを確かめた。第二節において後述するように、 M241 は $C\bar{1}s$ の C2 分解活性を 100% 阻害し、M81 は 50% 阻害したが、M365 は $C\bar{1}s$ の C2 分解活性には全く影響を与えなかった。故に M81 あるいは M241 の C2 分解活性阻害が過剰量の他の MAb の存在下で抑制されるか否かを検討した。図 8 A, C に示すように M81 の阻害活性は 過剰量の M365 の存在下でかわらず、M241 共存下では両者の阻害活性は互いに抑制されず和としてあらわれた。また M241 の阻害活性も M365 の存在下で減少することは無かった(図 8 B)。



(図 7) 未標識 MAb によるビオチン標識 MAb の $C\bar{1}s$ への結合阻止

$C\bar{1}s$ を固定した ELISA プレートをあらかじめ横軸に示している濃度の未標識 MAb (■ M81, ▲ M365, ● M241) と室温で 30 分間反応させた後、一定濃度のビオチン標識 MAb を各 well に加え更に 60 分間反応させた。ビオチン標識 MAb の$C\bar{1}s$への結合は avidin-peroxidase と基質を用いて測定した。縦軸に 492nm の吸光度を示した。
panel A, M81-biotin; panel B, M365-biotin; panel C, M241-biotin.



(図 8) 溶液中における各 MAb の $C\bar{1}s$への結合

一定量の $C\bar{1}s$ と横軸に示した濃度のMAbを過剰量の他のMAb存在下で30℃、30分間反応させた後、一定量のC2を反応液へ加え、更に30分間反応させた。MAb非存在下で$C\bar{1}s$により分解されたC2量を100%として縦軸に示した。

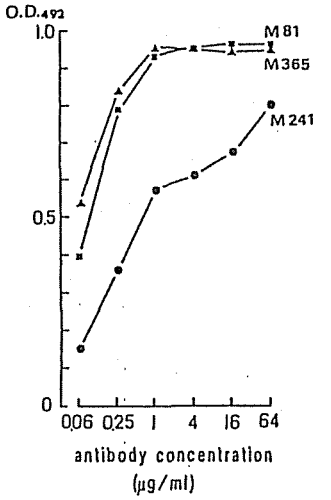
A, 過剰量の M365 共存下での M81 による C2 分解活性阻害
B, 過剰量の M365 共存下での M241 による C2 分解活性阻害
C, 過剰量の M81 共存下での M241 による C2 分解活性阻害

これらの事実より、3 種の MAb は互いに $C\bar{1}s$ 分子上の異なるエピトープを認識し、一つの抗体の結合により他の抗体の認識するエピトープが隠れるような近接した位置関係には無いと考えられた。

(4) 加熱処理あるいは阻害剤により不活性化された $C\bar{1}s$ への MAb の結合

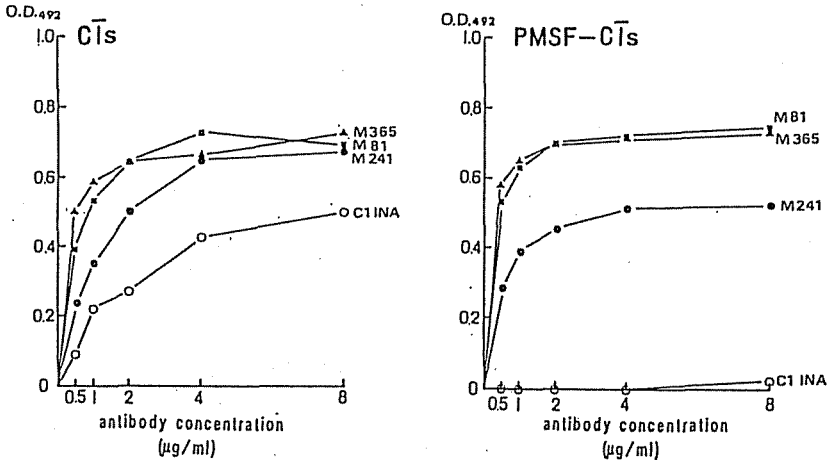
$C\bar{1}s$ を 56 ℃で 30 分間加温すると構造変化が起こり酵素活性は失われるが、その $C\bar{1}s$ に MAb が結合できるか否か ELISA 法にて検討した。 図 9 に示すように M81 と M365 のエピトープは熱に安定であった。一方 M241 は結合力が低下することから（図 4 参照）そのエピトープは加熱処理により影響をうけていると考えられた。

また活性セリン残基と結合することにより $\overline{C1s}$ を不活性化するセリンエステラーゼ阻害剤の PMSF で $\overline{C1s}$ を処理した後、各 MAb の結合の変化を ELISA 法で調べた。M81 と M365 は PMSF処理 $\overline{C1s}$ にも未処理 $\overline{C1s}$ と同等に結合したが、M241 の PMSF処理 $\overline{C1s}$ への結合活性は未処理 $\overline{C1s}$ に比べ低下した。一方、第三節において後述するように、$\overline{C1s}$の活性セリン残基と共有結合することにより $\overline{C1s}$ の活性を阻害する C1 INA は、PMSF 処理 $\overline{C1s}$ には結合できなかった（図 10）。



（図 9）MAb の加熱処理 $\overline{C1s}$ への結合活性

56℃、30分間加熱した $\overline{C1s}$ をマイクロプレートに固定し、各 MAb と反応させ、その結合の有無を HRP 結合抗マウス IgG と基質を用いて測定した。横軸に MAb の濃度、縦軸に結合活性を 492nm の吸光度で表した。



（図 10）MAb の $\overline{C1s}$ 及び PMSF 処理 $\overline{C1s}$ への結合活性

$\overline{C1s}$ あるいは PMSF 処理 $\overline{C1s}$ をマイクロプレートに固定し、横軸に示す濃度の MAb と反応させて結合活性を HRP 結合抗マウス IgG と基質を用いて測定した。縦軸に 492nm の吸光度を示した。

第二節　$C\bar{1}s$ の酵素活性に及ぼす MAb の影響

(1)　$C\bar{1}s$ の C4 及び C2 分解活性に及ぼす MAb の影響

$C\bar{1}s$ の C4, C2 分解活性は、$C\bar{1}s$ と一定量の C4 あるいは C2 を反応させた後、分解されていない C4 あるいは C2 量を、感作羊赤血球を用いる溶血反応で定量することによって測定した。補体成分の定量は、Mayer の提唱する One-hit theory に基づいて行われている。One－hit theory とは感作赤血球が補体と反応することにより溶血をひきおこすには、一連の補体成分の反応が血球膜上の一ケ所で完了すれば十分であるという考え方である。溶血反応で、血球当たりの補体による平均 hit 数を Z とし、個々の血球当たりの hit 数を r とすれば、r 個の hit を受けた血球の全血球に対する比率（Pr）は Poisson の分布式から

$$Pr=\frac{Z^r}{r!}e^{-z}$$　　となる。

one－hit theory が成立すれば hit を１つでも受けた血球はすべて溶けるのであるから、溶け残った血球の比率（1-y）は hit を全然受けなかった血球の比率（Po）に等しい。

ゆえに、

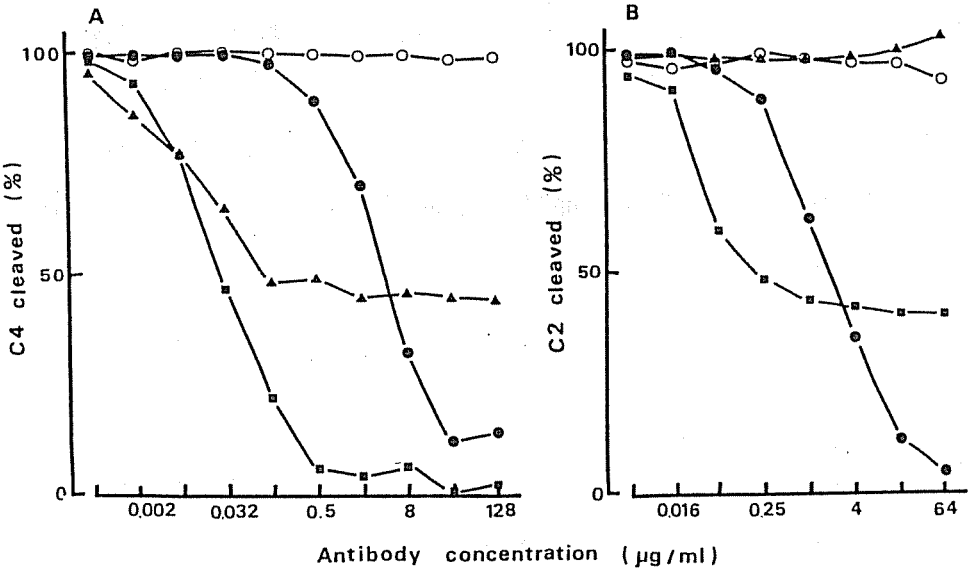
$$y=1-Po=1-e^{-z}$$

それゆえ、血球当たりの平均 hit 数は

$Z=-\ln(1-y)$ で計算される。

実際には、測定しようとする１成分以外の補体成分を過剰に加え、y を実測することによって、測定する成分の分子の反応数を Z と等しいとみなして計算できる。上記の方法で測定すると M241 は加えた

抗体の濃度に応じて $C\bar{1}s$ の C4、C2 分解活性を阻害し、抗体濃度 64 μg/ml で 100% の阻害効果を示した。一方 M81 の場合、C4 分解活性は M241 よりも低濃度の抗体量において 100% 阻害効果を示したが、C2 分解活性は抗体濃度を増加させても 50% しか阻止しなかった。また M365 は C4 分解活性のみ部分的に抑制したが、C2 分解活性に対しては、全く影響を与えなかった(図 11)。抗体を Fab フラグメントに分解しても同様の結果であった。



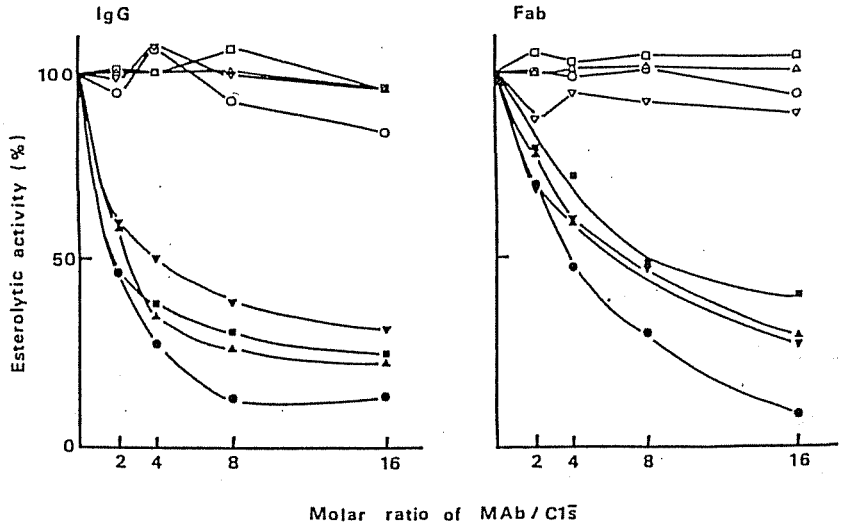
(図 11) $C\bar{1}s$ の C4 及び C2 分解活性に対する MAb の阻害効果
$C\bar{1}s$ を横軸に示す濃度の各 MAb (▲ M365, ■ M81, ● M241, ○ M80) と反応させた後一定量の C4 あるいは C2 を反応液へ加えた。MAb 非存在下で$C\bar{1}s$ により分解された基質量を 100% として縦軸に示した。

以上の結果より、C4 分解活性と C2 分解活性に対する MAb の阻害傾向が同一でないことが示され、$C\bar{1}s$ 上の C4 と C2 に対する活性部位が異なる可能性が示唆された。

(2) 合成基質の水解活性に対する MAb の影響

$C\bar{1}s$ は天然の基質である C4, C2 以外にアルギニン、リジンあるいはチロシンエステルなどの低分子の合成基質も加水分解する。このエステル分解反応における MAb の阻害効果を 4 種類の合成基質 (AAME, ALME, TAME, ATEE) を用いて検討した。$C\bar{1}s$ と MAb を反応させた後、各々の合成基質と一定時間反応させ加水分解されたエステルを Roberts の方法[15]に従い測定した。その結果、M241 のみ IgG でも Fab フラグメントでも、$C\bar{1}s$ のエステル水解反応を阻害した(図 12)。

M81 は C4 分解活性を 100% 阻害するにもかかわらずエステル分解反応には全く影響を与えず、M365 も同様に阻害活性はなかった。



(図 12) 合成基質の水解活性に対する MAb の影響

$C\bar{1}s$ を M81 (open symbol) あるいはM241 (closed symbol) とあらかじめ横軸に示しているモル比で反応させた後 4 種類の合成基質 (■ AAME, ▲ ALME, ▼ TAME, ● ATEE) を加えて30℃で1時間もしくは2時間反応させた。分解された基質量を Roberts の方法に従い定量した。MAb 非存在下での $C\bar{1}s$ のエステル分解活性を100% として縦軸に示した。左側のパネル、MAb-IgG; 右側のパネル、MAb-Fab フラグメント

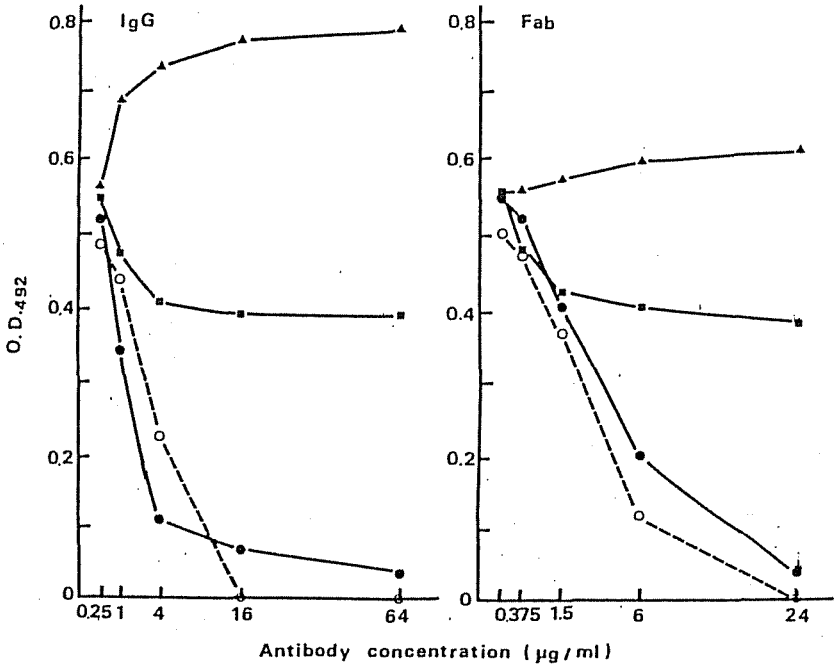
このことから、M241 は $C\bar{1}s$ の酵素反応の触媒部位もしくはその近傍に結合し阻害効果を示していると思われた。一方 M81 は触媒部位ではなく C4 結合部位に結合することにより阻害効果をあらわしていると考えられた。

第三節　C1 INA-$C\bar{1}s$ 複合体形成における MAb の影響

$C\bar{1}s$ 活性の天然の阻害物質は血漿中に存在する分子量約 110 kd の糖蛋白質の C1 INA である。C1 INA は $C\bar{1}s$ の活性セリン残基を介して $C\bar{1}s$ とエステル結合で結合し複合体を形成することにより $C\bar{1}s$ を不活性化する[16-18]。この複合体形成における MAb の阻害効果を検討した。マイクロプレートに固定された $C\bar{1}s$ と各 MAb、その Fab フラグメントあるいは C1 INA とをあらかじめ反応させた後、ビオチン標識 C1 INA を加え $C\bar{1}s$ への結合が阻害されるかどうかを調べた。図 13 に示すように C1 INA あるいは M241 を先に反応させた時のみ、biotin-C1 INA の $C\bar{1}s$ への結合は阻害された。M81 はわずかに阻害活性があるが、M365 は IgG の場合むしろ biotin-C1 INA の $C\bar{1}s$ への結合を増加させた。この理由は明らかではないが、図 7 に見られるように、M241 の $C\bar{1}s$ への結合も M365 により増加されることから、M365 の結合により $C\bar{1}s$ にコンフォメーションの変化が生じている可能性が考えられる。

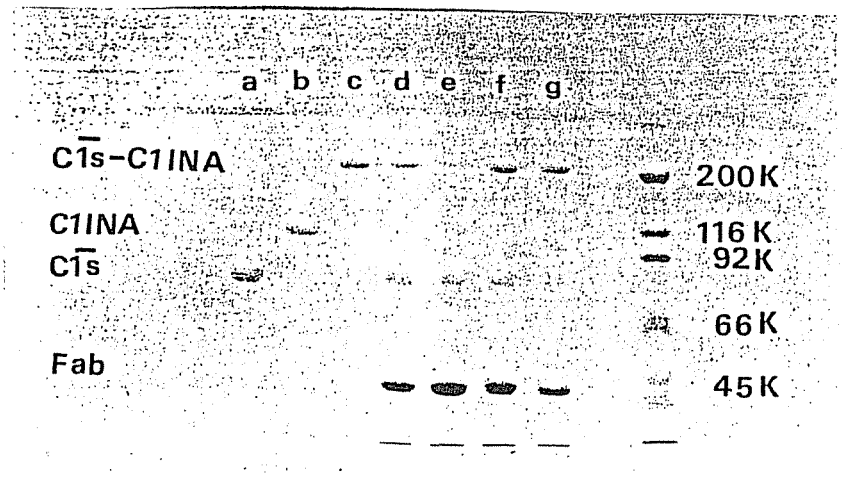
次に溶液中での $C\bar{1}s$-C1 INA 複合体形成に対する MAb の阻害効果を SDS-PAGE で調べた。$C\bar{1}s$ と各 MAb の Fab フラグメントとを 37℃, 20分、その後 4℃ 一晩反応させた後 $C\bar{1}s$ とほぼ等モルの

C1 INA を加え 37℃, 30分 反応後、反応生成物を 7,5% SDS-PAGE で解析した(図 14)。$\overline{C1s}$-C1 INA 複合体は SDS 存在下で解離せず、約 200 kd の位置に band が出現した。M241 を反応系に加えると lane e にみられるように複合体の形成は殆ど阻害された。また M81 の Fab フラグメント(lane f) ではコントロールの lane c に比べ残存 $\overline{C1s}$ がわずかに見られ、ELISA 法の時と同様複合体形成をわずかに阻害しているように思われた。M365 による複合体形成増強は認められなかった (lane g)。



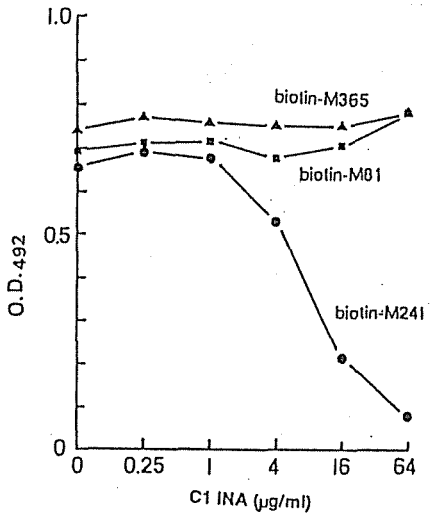
(図 13) MAb による C1 INA と $\overline{C1s}$ の結合阻害

$\overline{C1s}$を固定したマイクロプレートの各wellに横軸に示す濃度のMAbあるいはそのFabフラグメント(▲M365, ■M81, ●M241)あるいは C1 INA (○)を加えて室温で30分間反応させた。更に一定量のビオチン標識 C1 INA を加え室温で60分間反応させた後、その結合活性をavidin-peroxidase と基質を用いて測定した。縦軸に492nmの吸光度を示した。



(図 14) 溶液中での C1s-C1 INA 複合体形成における MAb の阻害効果　7.5% SDS-PAGE
lane a, C1s(2.85μg) ; b, C1INA(3.4μg); c, C1s+C1INA; d, M241(10μg)+C1s+C1INA; e, M241(30μg)+C1s+C1INA; f, M81(10μg)+C1s+C1INA; g, M365(10μg)+C1s+C1INA

更に、C1 INA-C1s 複合体への各 MAb の結合の有無を ELISA 法で検討した。図 15 に示すごとく、M241 は C1 INA が結合した C1s には全く結合できず M81 と M365 は結合可能であった。



(図 15)
MAbのC1INA-C1s複合体への結合
C1sを固定したマイクロプレートの各wellに横軸に示す濃度のC1INAを加え室温で30分間反応させた後、一定量のビオチン標識MAbを加え更に60分間反応させてその結合活性をavidin-peroxidaseと基質を用いて測定した。縦軸に492nmの吸光度を示した。

いは、$C\bar{1}s$ 上の C4 結合部位と C2 結合部位が互いに異なることを示唆している。C4 と C2 の結合部位が同一で、C2 の方がより強い親和力で結合するために MAb で阻害されにくいという可能性は、$C\bar{1}s$ の C4 に対する Km と C2 に対する Km が同じこと[20]から低いと思われる。

(3) M241 は活性型 $C\bar{1}s$ とのみ結合し、Fab フラグメントで C4、C2 及び合成基質の分解を完全に阻止し、活性セリン残基を介した C1 INA との複合体形成も阻害することから $C\bar{1}s$ の触媒部位もしくはそのごく近傍に結合する抗体であると考えられる。$C\bar{1}s$ を還元すると M241 は $C\bar{1}s$ に結合することができなくなることから、触媒部位近傍の立体構造を認識していると考えられる。活性セリン残基と結合することによりセリンプロテアーゼ阻害効果を示す PMSF で $C\bar{1}s$ を処理すると、C1 INAは結合できなくなる一方、M241 は結合力の低下は認められるものの結合しうる (図 10)。このことから M241 は $C\bar{1}s$ の触媒部位 を構成する活性セリン残基を直接的には認識するものではないと考えられる。

これら 3 種の抗体は、互いに $C\bar{1}s$ への結合を阻止しあわないことから認識するエピトープは互いに離れている。

近藤らは加熱または C1 INA 処理により $C\bar{1}$ の C4 と AAME に対する活性は失活しにくいが、C2 と ATME に対する活性は急速に失活すると報告している[21]。また高橋らは精製 $C\bar{1}s$ を用いて同様の結果を得、$C\bar{1}s$ 標品中に基質特異性及び阻害剤・加熱処理に対する感受性の異なる 2 種類の $C\bar{1}s$ 分子種が存在する可能性を指摘している[22]。

しかし著者の実験において、加熱処理(56℃、30分)した $C\bar{1}s$ や C1 INA の結合した $C\bar{1}s$ に対して、M241 の結合力は低下あるいは全

第四節　要約ならびに考察

Villiers らは電子顕微鏡写真から、$C\bar{1}s$は二つの globular domain からなり、大きい方の catalytic domain は H 鎖の C 末端の一部と L 鎖から構成されていることを示し、$C\bar{1}s$ の活性発現に H 鎖が関与していることを示唆した[19]。

今回の MAb を用いた種々の解析をまとめると表 2 のようになり、$C\bar{1}s$ の活性部位に関して以下の事実が明らかになった。

表　2

MAb	結合活性		酵素活性阻害（%）			$C\bar{1}s$-C1INA 複合体
	$C\bar{1}s$	C1s	C4	C2	合成基質	形成阻害（%）
M365	+（H）	+	50	0	0	0
M81	+（H）	+	100	50	0	30
M241	+	-	100	100	90	100

(1) M81 は $C\bar{1}s$ の H 鎖上のエピトープを認識し、C4 分解活性を100 % 抑制するが、C2 分解活性は 50% しか抑制せず、低分子の合成基質の水解活性は全く阻害しない。また酵素活性を持たない pro-C1s とも反応する。これらの事は、M81 が $C\bar{1}s$ の触媒活性部位にむけられた抗体ではなく、C4 結合部位あるいはその近傍を認識する抗体であることを示しており、C4 結合部位が H 鎖上に存在することを明らかにした。

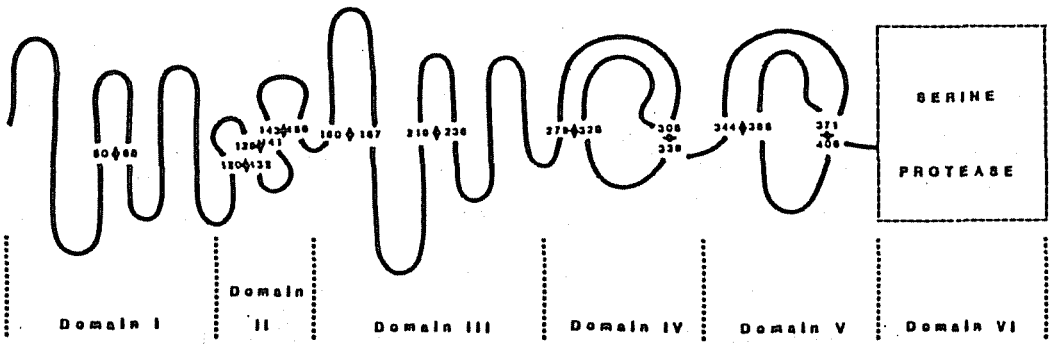
(2) 一方、M365 は M81 が認識するエピトープとは異なる H 鎖上のエピトープを認識し、C4 分解活性を 50% 程度抑制するが、C2 分解活性には全く影響を与えない。M81 と M365 の活性阻止パターンの違

く失われる一方、C4 結合部位を認識する M81 は未処理 $C\bar{1}s$ に対するのと同等に結合し得た（図 9,15)。 $C\bar{1}s$ の C4 分解活性が熱処理や C1 INA 処理により失活しにくい理由は、2 種類の $C\bar{1}s$ 分子種が存在するためではなく、恐らく C4 結合部位が熱に対して安定であり、C1 INA-$C\bar{1}s$ 複合体となってもフリー $C\bar{1}s$ 上と同じように存在しているためであろうと考えられる。

C2 分解活性のみ 100% 阻害する MAb は得られていない。故に C2 に対する基質結合部位はいまだ明らかでなく、その部位が加熱に対する感受性が高いか否か不明である。しかしながら、M81 は C2 分解活性も C1 INA の $C\bar{1}s$ への結合も部分的に抑制することを考えれば、C2 結合部位と C1 INA 結合部位が近接した位置もしくは同じであるために、C1 INA 処理により C2 分解活性が失活しやすくなることが考えられる。合成基質の水解反応に関して M241 の阻害程度には差があり（AAME 分解反応は阻害しにくく、ATEE は最も阻害しやすい）、触媒部位における酵素と各基質の反応性の違いをあらわしていると思われる。

第二章　$\overline{C1s}$ の C4 結合ドメインの同定[23]

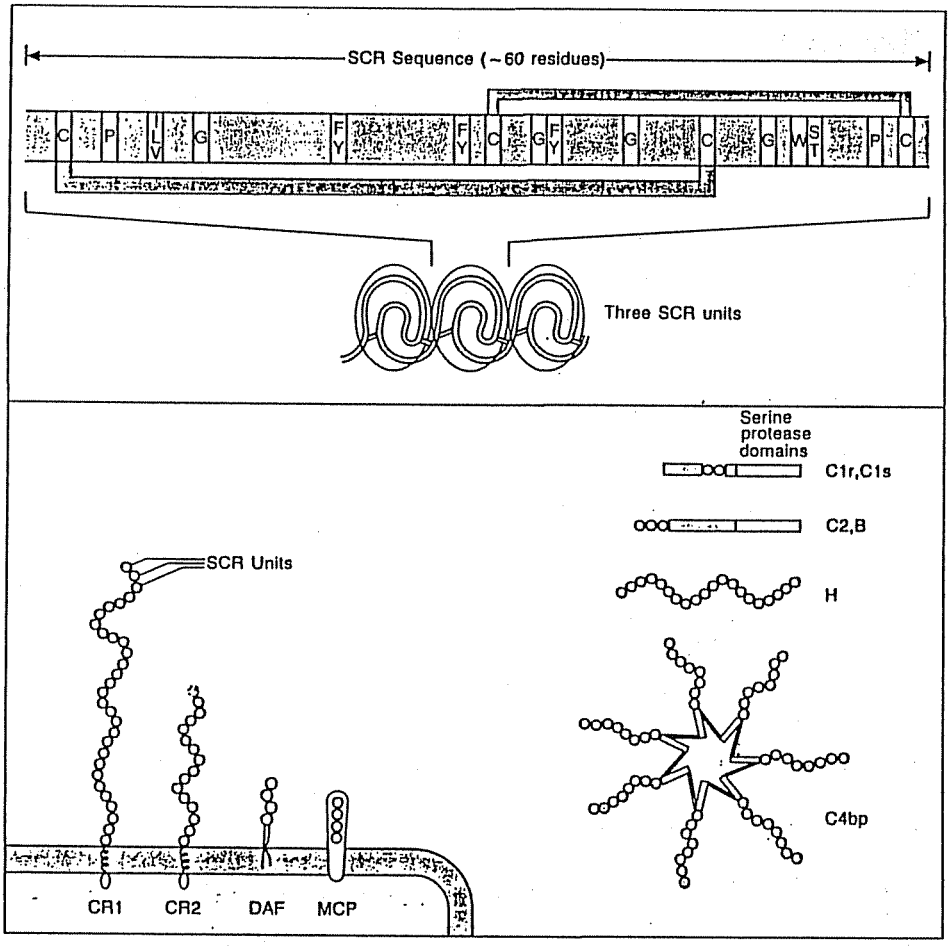
1988 年　MacKinnon[24] らや Tosi[25] らの二つの研究グループにより C1s の全アミノ酸配列が明らかにされ、活性セリン残基を含む L 鎖のみでなく H 鎖も C1r と高い相同性を示すこと、また H 鎖は 5 個のドメインから構成され、C1s の機能発現に各ドメインが関与している可能性があることが示唆された（図 16）。



（図 16）C1s の一次構造モデル[24]

ドメインⅠとⅢのアミノ酸配列は C1r と C1s に特有の構造である。ドメインⅡはシステイン残基に富み epidermal growth factor のアミノ酸配列の一部と相同性がある。ドメインⅣとⅤ（γドメイン）は共に short consensus repeat (SCR) と呼ばれる約 60 個のアミノ酸残基からなる構造をしている。この SCRs は C3b や C4b 結合性蛋白質に特徴的に見いだされる繰り返し構造で、補体系の活性化に関係する B[26], C2[27] あるいは補体系の制御蛋白質である H[28], C4bp[29], DAF[30], CR1[31], CR2[32], MCP[33]などに存在する（図 17)。この点から、C1r や C1s の SCRs が C3b や C4b と何等かの相互作用をして

いる可能性が示唆されているが直接的証拠は得られていない。また、ドメインⅢとⅤに1か所ずつ糖結合部位が存在するが、糖鎖構造及びその機能は不明である。



（図 17） SCRs の構造及び SCRs をもつ補体系蛋白
（COMPLEMENT より引用）

本章においては、(1) C4 結合ドメインの同定、(2) $C\bar{1}s$ の糖鎖構造、(3) $C\bar{1}s$ の SCRs ドメインへの C4/C4b の結合について述べる。

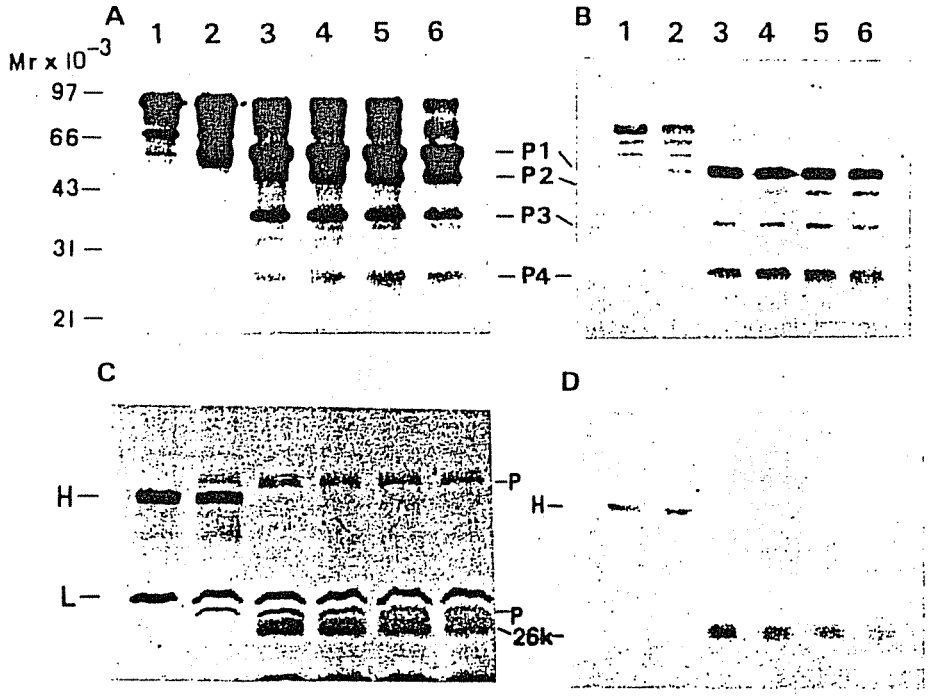
第一節　$C\bar{1}s$ の C4 結合ドメインの同定

(1) プラスミンによる $C\bar{1}s$ の限定分解

C4 結合部位を含む $C\bar{1}s$ の分解フラグメントを得るため、$C\bar{1}s$ の酵素処理を検討した。$C\bar{1}s$ の酵素処理としては Villiers らによるプラスミン分解[19]と岡田らによるカリクレイン分解[34]がすでに報告されているが、著者らは補体系と関連の深い線溶系の酵素でありトリプシン類似の基質特異性を示すプラスミンを用いて $C\bar{1}s$ を限定分解した。プラスミンは永木らにより精製された標品を用いた[35]。$C\bar{1}s$ とプラスミンを重量比 20:1 で混合し 37℃ で反応させて、時間毎にSDS-PAGE 緩衝液中にくみだした。

生成フラグメントを 10% SDS-PAGE で解析すると、図 18A に示すように、最終的に 4 種の $C\bar{1}s$ フラグメントが生成された。$C\bar{1}s$ は精製途中あるいは凍結融解の過程で分解され 74 kdと 68 kd の 分解産物が微量混在している。この $C\bar{1}s$ をプラスミンと 37℃ で反応させると、15分後には $C\bar{1}s$ 及び微量の $C\bar{1}s$ 分解産物が消失するとともに、新たに分子量 58 kd, 48 kd, 37 kd, 27 kd のプラスミン分解フラグメントが現れた。各々をそれぞれ P1, P2, P3, P4 と命名した。P2 は時間の経過とともに量が増え 60 分でその増加はとまるが、P1, P3, P4 は、120 分後においても 15 分時と比べ量的変化は見られなかった。P1 は生成フラグメント量の 90% 以上を占め、プラスミンによる $C\bar{1}s$ 分解の主なフラグメントと考えられた。同じ標品を還元して、SDS-PAGE で解析すると、図 18C に示すように、$C\bar{1}s$ の H 鎖は消失し、L 鎖以外に新たに 26 kd と 15 kd のバンドが現れた。

還元、非還元両条件下で SDS-PAGE 後ニトロセルロース膜に転写し、$C\bar{1}s$ の C4 分解活性を完全に阻止するモノクローナル抗体 M81との反応性を Immuno-blotting 法で調べた。非還元条件下では M81 は P1-P4 の各フラグメントに結合し(図 18B), 還元条件下では 26 kd フラグメントにのみ結合した(図 18D)。



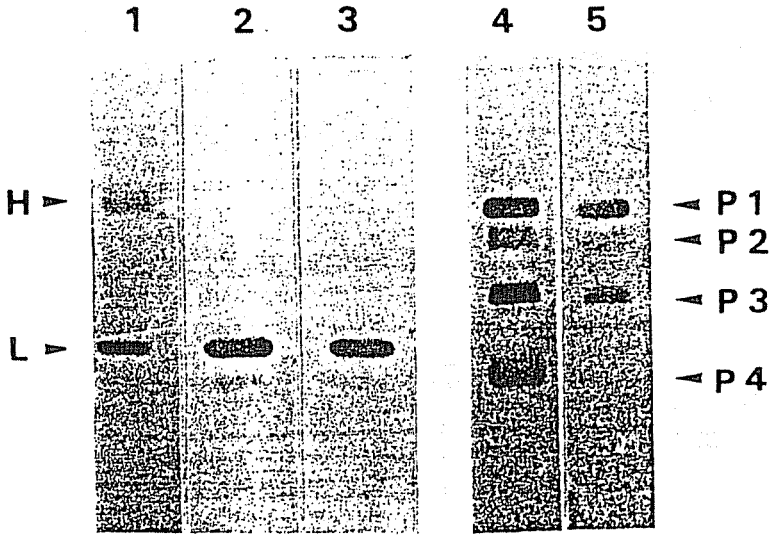
(図 18) $C\bar{1}s$ のプラスミンによる限定分解の kinetics

lane 1, $C\bar{1}s$; lane 2-6, $C\bar{1}s$ とプラスミンの反応時間、 0, 15, 30, 60, 120 min. A,B, 非還元条件； C,D, 還元条件； A,C, 銀染色； B,D, M81 による Immuno-blotting; P, プラスミンの H 鎖及び L 鎖

(2) $C\bar{1}s$ のプラスミン分解フラグメントの構造解析

P1-P4 の組成を明らかにするため、$C\bar{1}s$ の L 鎖上の異なるエピトープを認識する MAb 2 種 (M86, M9, 表 1 参照) を選んで Immuno-

blotting を行った。$C\bar{1}s$ とプラスミンを重量比 20:1 で 37℃, 2 時間反応させた後 SDS-PAGE (10%) を行い、続いてニトロセルロース膜に転写した。図 19 に示すように、M86 は P1-P4 すべてのフラグメントに結合し、M9 は P4 以外のフラグメントに結合した。故に、P1-P4 の各フラグメントはすべて L 鎖あるいは L 鎖の一部を含んでいることが明らかとなった。

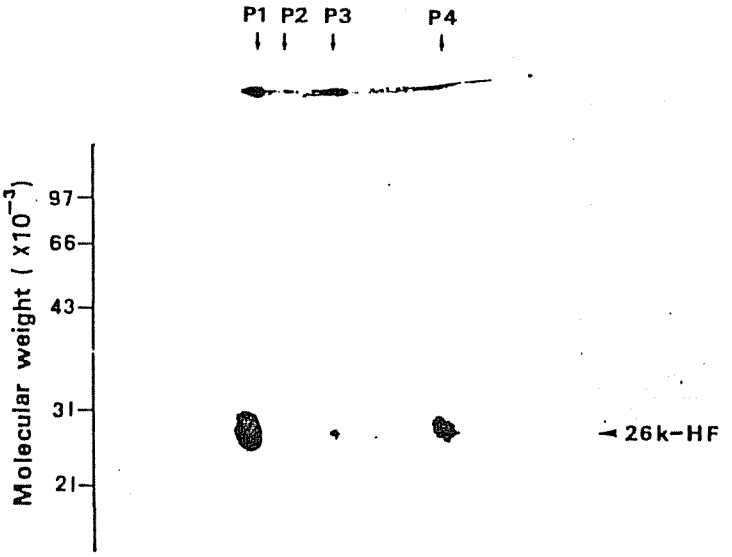


(図 19) M9 及び M86 による Immuno-blotting

lane 1, 還元 $C\bar{1}s$ のアミドブラック染色
2, 還元 $C\bar{1}s$ への M86 の結合
3, 還元 $C\bar{1}s$ への M9 の結合
4, P1-P4 への M86 の結合 (非還元条件下)
5, P1-P4 への M9 の結合 (非還元条件下)

更に同じ標品を非還元条件下で DISK-PAGE (10%) をおこない (一次元)、引き続き還元条件下で SDS-PAGE (10%) (二次元) を行った。ニトロセルロース膜に転写後 M81 (C4 結合部位と反応する MAb)

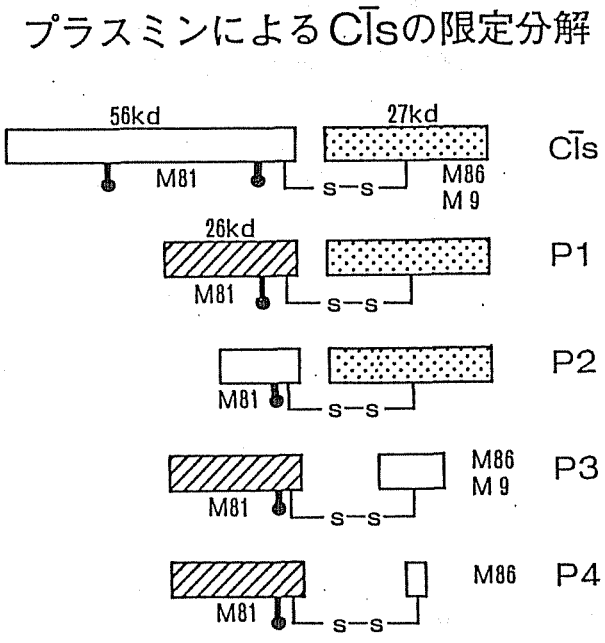
及び M86 (L 鎖と反応する MAb) を用いて Immuno-blotting をおこなうと、M81 は P1, P3, P4 の 26 kd の H 鎖フラグメント (26k-HF) と反応した。各々の 26k-HF には 不均一性があり、2～3 本のバンドがみられた (図 20)。



(図 20) $C\bar{1}s$ のプラスミン分解フラグメントの二次元 SDS-PAGE
$C\bar{1}s$ とプラスミンを重量比 20:1 で37℃、2時間反応させた後、非還元条件下で DISK-PAGE を行い (一次元)、引き続き還元条件下で SDS-PAGE (二次元) を行った。ニトロセルロース膜に転写後 M81 と反応させた。

非還元条件下では M81 は P2 と反応しうるが、還元すると P2 の H 鎖フラグメントは検出されなかった。L 鎖上のエピトープを認識する M86 による Immuno-blotting から、P1, P2 は 31 kd の L 鎖を持つことが示された。以上の結果より、P1 は 26k-HF と L 鎖、P2 は 26k-HF より分子量の小さい H 鎖フラグメントと L 鎖、P3, P4 は 26k-HF と L 鎖の分解フラグメント (各々約 10 kd と 1 kd) で構成

されていると考えられた（図 21）。



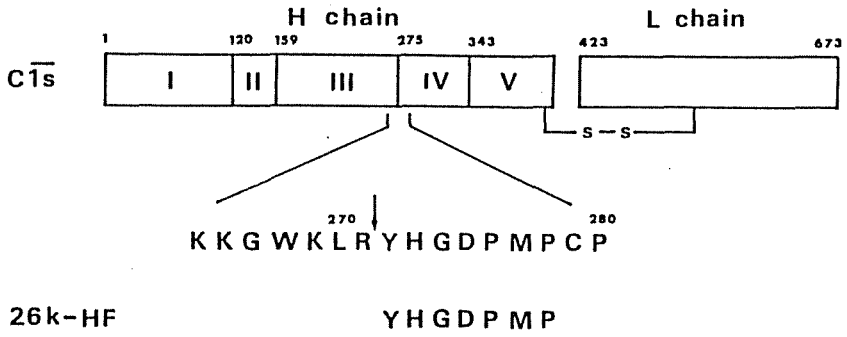
（図 21）
P1-P4 の推定構造

(3) 26k-HF の N 末端アミノ酸分析

C4 結合部位を含む最小のフラグメントは 26k-HF であることが明らかになったので、26k-HF を精製し、N 末端アミノ酸分析を行った。M81 結合セファローズ 4B カラムを用いて C1s を大量に精製後プラスミンで分解した。調製用 SDS-PAGE（10% 非還元）で最も生成量の多い P1 を分離し、エクストラフォーを用いて P1 蛋白を回収した。更に還元条件下で再度調製用 SDS-PAGE（10%）をおこない、26k-HFを再びエクストラフォーを用いて回収して N 末端アミノ酸配列をアミノ酸シークエンサーで決定した。その結果 N 末端より Tyr-His-Gly-Asp-Pro-Met-Pro であることが判明した。C1s の全アミノ酸配列と比較すると、プラスミンによる H 鎖の切断場所はドメインⅢとドメイ

ンⅣの間に位置する ^{271}Arg-^{272}Tyr 結合であることが明らかとなった（図 22)。

26k-HF の分子量とこのフラグメントが L 鎖との S-S 結合に関与する ^{410}Cys を含んでいることを考え合わせると、26k-HF はドメインⅣとⅤより構成されていると考えられた。すなわち C4 結合部位はドメインⅣあるいはⅤに存在する。



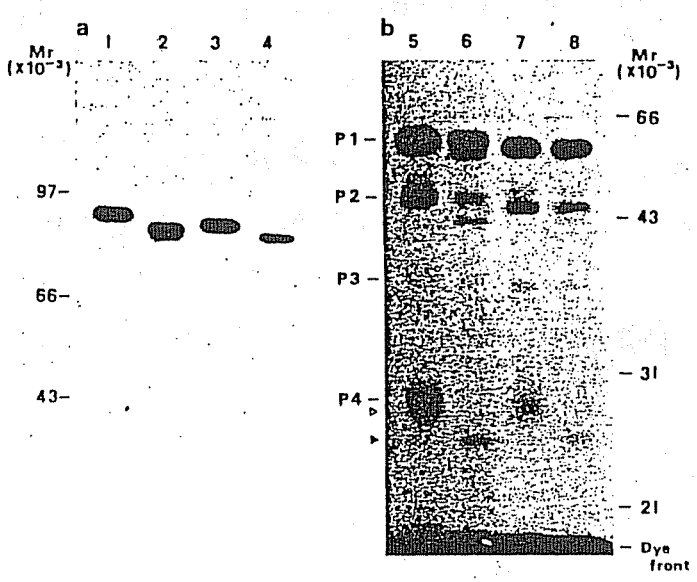
（図 22）C1s と 26k-HF のアミノ酸配列の比較
矢印はプラスミンの C1s H 鎖切断部位を示している。

第二節　C1s の糖鎖構造

C1s の糖鎖構造を明らかにするため C1s を^{125}I で標識しプラスミンと重量比 20:1 の割合で 37℃、2 時間反応させた後、endo-glycosidase-H, endoglycosidase-F, N-glycanase, O-glycanase あるいは neuraminidase で処理した。

Endoglycosidase-H, endoglycosidase-F, O-glycanase 処理では C1s およびプラスミン分解フラグメントの分子量に差は認められなかった。一方、N-glycanase 処理で C1s の分子量は約 3,000 減少し、

(図 23a, lane 2)、neuraminidase 処理後引き続いて N-glycanase で処理すると、分子量は約 4,000 減少した (図 23a, lane 4)。
P1 は N-glycanase 処理でその分子量は変化しなかったが、最も小さいフラグメント P4 は分子量が約 2,500 減少したことにより(図 23b lane 6) ドメインVに存在する糖は L 鎖の大部分が除去されてはじめて N-glycanase に感受性をもつようになるものと思われる。
Neuraminidase 処理で P1-P4 の分子量は各々約 800 減少し(図 23b, lane 7)、neuraminidase 処理後 N-glycanase 処理すると P1-P3 は neuraminidase 単独処理と同じで P4 の分子量のみ約 2,500 減少した (図 23b, lane 8)。



(図 23) a) $C\bar{1}s$の糖鎖除去 (7.5%ゲル)
b) $C\bar{1}s$のプラスミン分解フラグメントの糖鎖除去 (10%ゲル)
^{125}I 標識 $C\bar{1}s$ あるいは ^{125}I 標識 $C\bar{1}s$ のプラスミン分解フラグメントを N-glycanase (lane 2,6)、 neuraminidase 処理 (lane 3,7)、あるいは neuraminidase 処理後 N-glycanase処理 (lane4,8) し、SDS-PAGE 後オートラジオグラムで解析した(lane 1,5 コントロール)。

以上の結果より、ドメインVに存在する糖はシアル酸を含んだアスパラギン結合糖鎖でその分子量は約 2,500 と推定された。完全な L 鎖をもつ P1 は N-glycanase に抵抗性であるので、N-glycanase による $C\bar{1}s$ の分子量の減少(図 23a, lane 2) はドメインIIIに存在する N-linked oligosaccharide の除去を反映していると思われた。また、$C\bar{1}s$ を neuraminidase 処理すると分子量が約 1,500 減少することから(図 23a, lane 3)、ドメインIIIの糖鎖もシアル酸を含んでいると考えられた。図 23b の lane 6 において、P1 および P2 の一部に N-glycanase 処理による分子量の減少がみられるが、再現的ではなく、ある実験条件下では P1 及び P2 のドメインVの糖鎖も N-glycanase に感受性をもつようになると思われた。

Immuno-blotting では、これらの糖鎖除去 $C\bar{1}s$ に M81 は未処理 $C\bar{1}s$ と同等に結合しうるので、C4 結合部位に糖鎖は関与していないと考えられた。

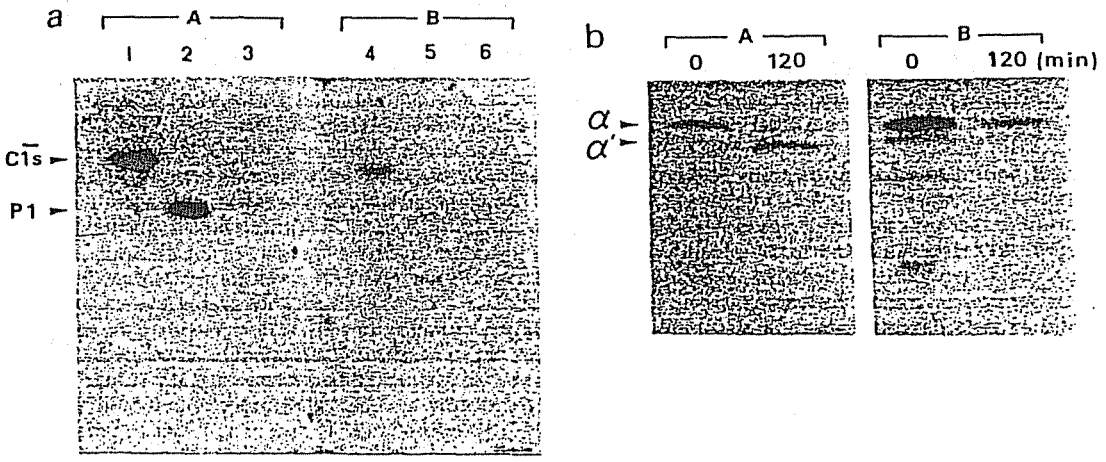
第三節　$C\bar{1}s$ の SCRs ドメインへの C4/C4b の結合

C4 結合部位を含むドメインIVとVは SCRs とよばれる構造をしており、この構造を持つ補体系蛋白はすべて C4b あるいは C3b に結合することが知られている。故に $C\bar{1}s$ のこのドメインが実際に C4 と結合しうるかまた C4b にも親和性があるかどうか、^{125}I 標識C4/C4b による substrate-blotting をおこなって検討した。

(1) ^{125}I-C4 による substrate-blotting

$C\bar{1}s$、$C\bar{1}s$ のプラスミン分解フラグメント(P1-P4)、及びコントロール蛋白としての C9 を SDS-PAGE 後ニトロセルロース膜に転写した。

非特異的結合を防ぐ為ニトロセルロース膜を 3% BSA-PBS と反応させた後、^{125}I 標識 C4 と室温で 2 時間反応させその結合をオートラジオグラムで解析した(図 24 a)。一方、反応液中の C4 が限定分解され C4b に変換しているか否かを SDS-PAGE とオートラジオグラムで解析した(図 24 b)。



(図 24) ^{125}I-C4 の C1̄s 及び P1-P4 への結合と M81 による阻止

a) lane 1, 4, C1̄s; lane 2, 5, P1-P4; lane 3, 6, C9;
sheet A, ^{125}I-C4 ; sheet B, M81 存在下での^{125}I-C4 の反応
b) sheet A あるいは B と反応する前 (0分) と反応した後 (120分) の^{125}I-C4、7.5%還元条件下 SDS-PAGE

図 24 a-A に示すように、^{125}I の放射活性は C1̄s と P1 の位置にのみ検出され、他のフラグメント及び C9 の位置には検出されなかった。この時反応液中の C4 の大部分はα鎖がα′鎖に変換していることより C4b に変わっていた(図 24 b-A)。ニトロセルロース膜を先に M81 で処理しそのあと^{125}I-C4 を反応させると、反応液中の C4 の分解は阻止され (図 24 b-B) C1̄sと P1 への結合も抑制された(図 24 a-B)。

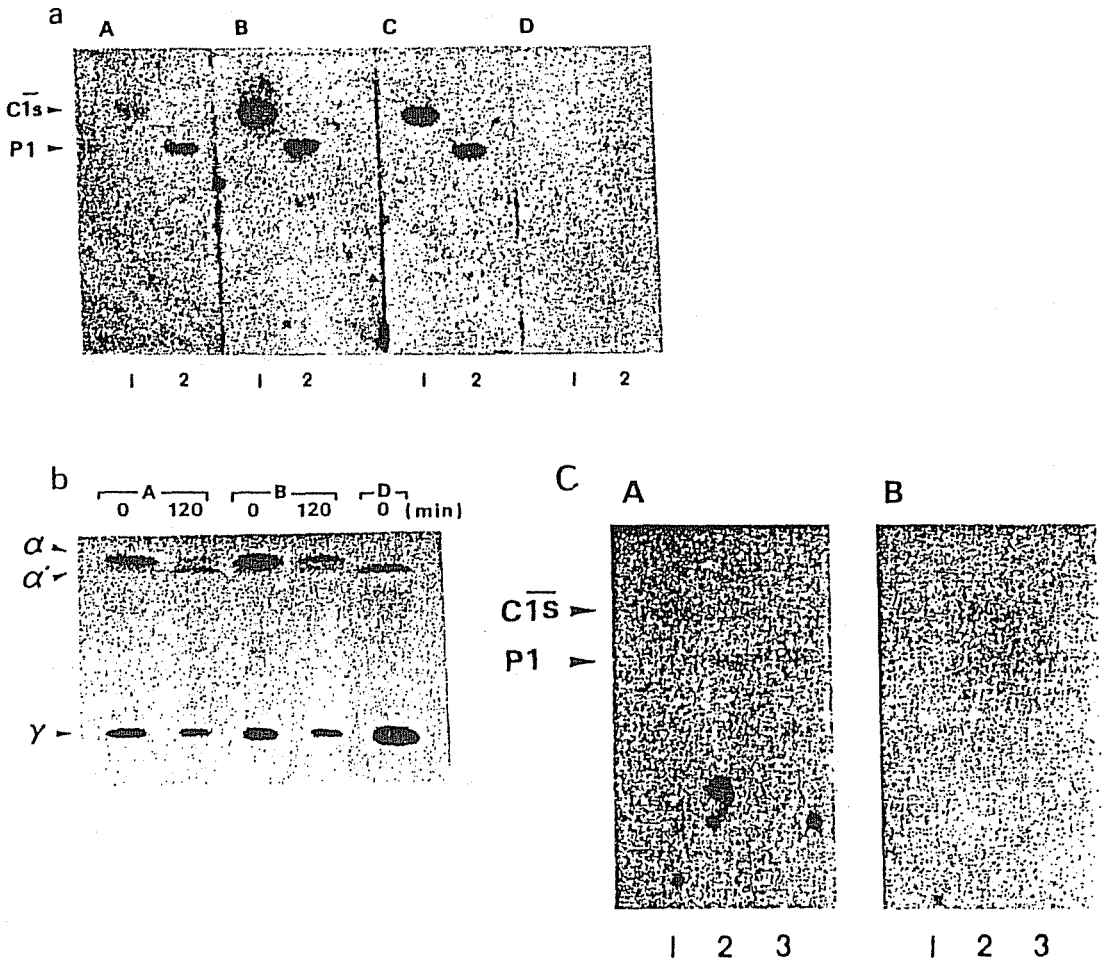
このことは、C4 の限定分解反応において、C4 が $C\bar{1}s$ 上の C4 結合部位に結合することが反応の第一段階であることを意味している。

(2) $C\bar{1}s$ の SCRs ドメインへの C4 の結合

L 鎖内に存在する触媒部位をセリンエステラーゼ阻害剤である p-APMSF で阻害し C4 の分解が生じないようにした時、^{125}I-C4が $C\bar{1}s$ 及びプラスミン分解フラグメントに結合しうるか否か検討した。図 25 panel a-B に示すように、^{125}I-C4 は^{125}I-C4b へ変換された時 (図 25 panel a-A)よりも $C\bar{1}s$ と P1 に強く結合した。一方、P2, P3, P4 への^{125}I-C4 の結合は検出されなかった。P3, P4 の場合、L 鎖の一部が除去されているためドメインⅣ、Ⅴのみでは安定な結合が維持できないためと思われる。P2 の場合、M81 と反応しうる H 鎖フラグメントと完全な L 鎖があるにも拘わらず C4 は結合しなかった。C4 の $C\bar{1}s$ への結合には、恐らく完全な L 鎖とドメインⅣ、Ⅴが必要と思われる。

(3) $C\bar{1}s$ の SCRs ドメインへの C4b の結合

$C\bar{1}s$ の SCRs へ C4b もリガンドとして結合しうるか否か検討した。図 25 panel a-C は、セリンエステラーゼ阻害剤存在下で^{125}I-C4 と 20 倍量の C4b を反応させて^{125}I-C4 の結合が C4b で阻害されるかどうかみたものである。20 倍量の C4b の存在下でわずかに^{125}I-C4 の結合は阻害された。一方、図 25 panel a-D で示すように^{125}I-C4b の $C\bar{1}s$, P1 への結合は非常に弱いものであった。また図 25 panel c に示すごとく、^{125}I-C4b の結合は 3 倍量の C4 が反応液中に存在するとおさえられることから、SCRs ドメインに対する C4b の結合は弱く、C4 の方により強い親和性があることが明らかである。



(図 25) ^{125}I-C4/C4b の $C\bar{1}s$ 及び P1-P4 への結合

Panel a) lane 1, $C\bar{1}s$; lane 2, P1-P4.
A, ^{125}I-C4; B, p-APMSF+^{125}I-C4;
C, p-APMSF+^{125}I-C4+ 20倍量未標識 C4b; D, ^{125}I-C4b.

Panel b) sheet A, B, D の反応液中の^{125}I-C4 の 7.5% SDS-PAGE.
0, ^{125}I-C4 の反応時間 0 分;
120, ^{125}I-C4 の反応時間 120 分.

Panel c) lane 1, $C\bar{1}s$; lane 2, P1-P4; lane 3, C9;
sheet A, p-APMSF+^{125}I-C4b;
sheet B, p-APMSF+^{125}I-C4b+3倍量未標識 C4.

精製^{125}I-C4b の $C\bar{1}s$, P1への結合（図 25 panel a-D）が^{125}I-C4 から^{125}I-C4b へと変換された直後の結合に比べ（図 25 panel a-A）非常に弱いのは、変換された C4b と精製 C4b との間にコンフォメーションの違いがあるためか、あるいは $C\bar{1}s$ 及び P1 によって分解された C4b が SCRs の近傍に多量に存在するため結合しやすくなるのいずれかと考えられる。

第四節　要約ならびに考察

$C\bar{1}s$ の H 鎖上の C4 結合部位もしくはその近傍に結合することによって $C\bar{1}s$ の C4 分解活性を阻止するモノクローナル抗体 M81を用いて、C4 結合部位を含むドメインを同定した。$C\bar{1}s$ のプラスミン分解フラグメントは P1 (58 kd), P2 (48 kd), P3 (37 kd), P4(27 kd) の 4 種であり、これらフラグメントは P2 を除いてすべて 26 kd の H 鎖フラグメント(26k-HF) を共有し、M81 は 26k-HFに結合した。P1の 26k-HF の N 末端アミノ酸分析により、26k-HF は 2 個の SCR から構成されるドメインⅣとⅤ(γドメイン)であることが明らかになった。故に C4 結合部位はγドメイン内に存在する。

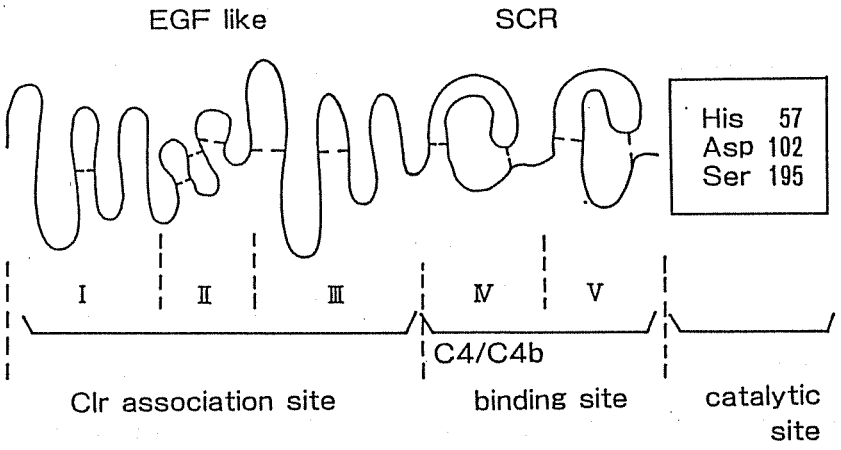
P3 と P4 の 26k-HF の N 末端アミノ酸配列は明らかではないが、恐らく P1 の 26k-HF と同一のものと考えられる。理由は P1, P3, P4 とも (1) 糖鎖を持っていること(図 23)、(2) M81 のエピトープを含んでいること(図 18)、(3) ^{410}Cys 残基を含んでいること(図 19)、(4) 二次元SDS-PAGE で同じ移動度で泳動されること(図 20) の 4 点である。 26k-HF の N 末端アミノ酸配列は単一にもかかわらず電気

移動度に不均一性がみられるが、これはドメインVに存在する糖鎖に由来すると思われる。事実 N-glycanase 処理により P4 の不均一性は消失した。

Villiers らは $C\bar{1}s$ をプラスミンで限定分解すると II 鎖の一部が切断を受け、74 kd の $C\bar{1}s$-I がまず生成され、更に II 鎖フラグメントが離れて最終的に 54 kd の $C\bar{1}s$-II が生成されると報告している[19]。しかしながら著者らの実験においては、$C\bar{1}s$-II に相当すると思われる P1 以外により分子量の小さいフラグメント P2, P3, P4 の生成がみられた。プラスミンによる $C\bar{1}s$ の分解過程は再現性があり、また異なるロットの精製 $C\bar{1}s$ においても、Villiers らが使用した Kabi-Vitrum 社のプラスミンを用いても同様の結果が得られた。
Villiers らの結果と異なる理由の一つとして、著者らの実験においてもクマシブルーでは P1 のみが染色されたことから、 P2, P3, P4 の生成量は銀染色でしか染まらない程のわずかな量であるという点である。しかしながら精製 $C\bar{1}s$ に 不均一性が存在し、プラスミンによる切断パターンが異なるという可能性も否定はできない。

今回の実験において、$C\bar{1}s$ の SCRs が C4/C4b の acceptor として機能していることを substrate-blotting 法を用いることにより初めて明らかにした。SCRs をもつ補体関連蛋白質はすべて C3b/C4b と相互作用をすることが知られているので、C4 を主なリガンドとする $C\bar{1}s$ の SCRs の sequence は非常に興味深いものである。$C\bar{1}s$ の一次構造の解明により $C\bar{1}s$ のドメイン構造が明らかとなり、$C\bar{1}s$ の機能発現における各ドメインの役割は著者らの実験もあわせて以下のように考えられる (図 26)。

Clsのドメイン構造



(図 26)

ドメインⅠ，Ⅱ，Ⅲはカルシウムイオンを介しての Clr と Cls の結合に関与し[24)25)]、ドメインⅣ，Ⅴは C4/C4b の acceptor として機能し、L 鎖は触媒機能を有し、ドメインⅣ，Ⅴと L 鎖により酵素活性ドメインが形成されているのであろう。

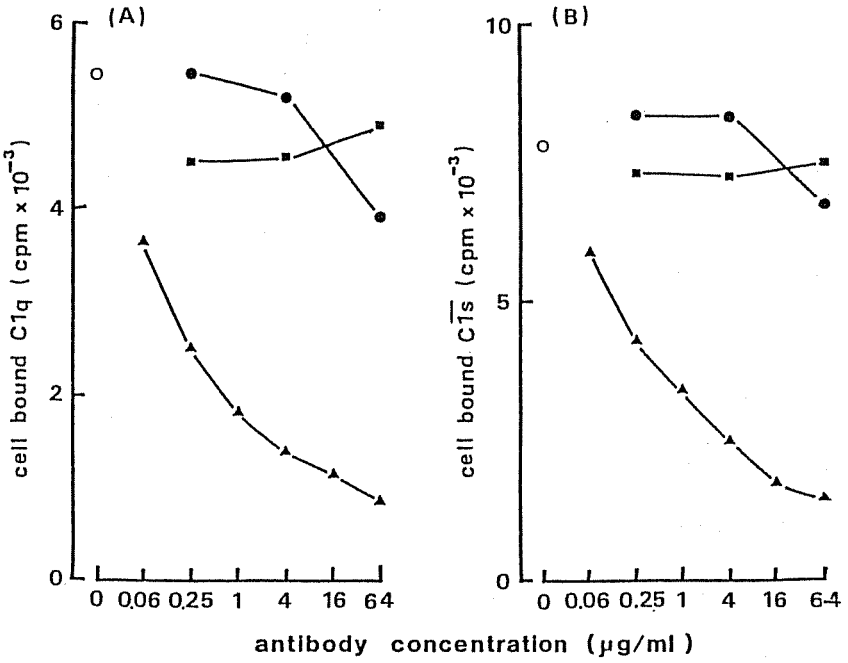
第三章　免疫複合体と C1 の相互作用における MAb の影響[36)]

生体内において、 C1s はフリーの状態では存在せず C1 複合体内で $C1r_2$-$C1s_2$ 四量体として存在しその機能を発揮する。
$C1r_2$-$C1s_2$ は 8 個の球状ドメインからなる細長いヒモ状構造で[19)]、C1の中では折り畳まれた状態で C1q のコラーゲン様部分に結合していると考えられその四次構造について近年いくつかのモデルが提唱されている（図 2)[5)37)]。免疫複合体による補体の活性化は C1q 分子の球状ドメインが IgG の Cγ2 ドメイン[38-40)]あるいは IgM の Cμ4 ドメイン[41)42)]に結合することにより C1r が活性型 $\overline{C1r}$ となって C1s を限定分解し活性型 $\overline{C1s}$ が生じることが第一段階であるが、C1q と 免疫グロブリンの結合から $\overline{C1s}$ 生成にいたるメカニズムは明らかではない。更に C1 と 免疫グロブリンの結合に C1q の球状ドメインのみでなく $C1r_2$-$C1s_2$ も関与しているという報告もある[43)]。そこで免疫複合体と C1 の相互作用において $\overline{C1s}$ に対する MAb がいかなる影響を及ぼすか検討を加えた。

第一節　モノクローナル抗体 M365 による免疫複合体からの $\overline{C1}$ の遊離

(1) C1q, C1r, C1s 各々を血漿より精製し、C1q あるいは C1s を ^{125}I で標識後 Ziccardi の方法に従い C1 を再構成した[44)]。免疫複合体としてはウサギ抗羊赤血球抗体（主に IgM）で感作した羊赤血球（EA）を用いた。EA に ^{125}I-C1 を結合させた後各 MAb を反応させると M365 と反応した時のみ細胞上の ^{125}I-C1q 及び ^{125}I-$\overline{C1s}$ の放射

活性が M365 の量に応じて減少し上清中に回収された（図 27)。

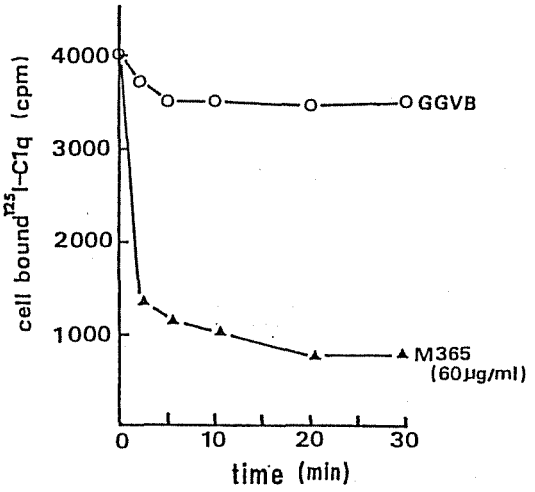


（図 27） M365 による EA からの $C\bar{1}$ の遊離

^{125}I 標識 C1q(A)あるいは^{125}I標識 $C\bar{1}s$(B) を含む EAC1 と横軸に示した濃度のMAb（ ▲ M365, ■ M81, ● M241）を30℃、30分間反応させた後遠心し、上清と細胞に分離し各々の放射活性を測定した。

panel A, EA 上の C1q の放射活性
panel B, EA 上の $C\bar{1}s$ の放射活性

すなわち M365 が $C\bar{1}$ 複合体内の $C\bar{1}s$ に結合することにより $C\bar{1}$ 複合体が EA から遊離してくることが考えられた。M81 あるいは M241 では $C\bar{1}$ 遊離の現象は見られなかった。M365 による EA からの $C\bar{1}$ の遊離速度は非常に速く、2分以内で EA に結合している ^{125}I-C1q の 65% 以上が遊離した(図 28)。

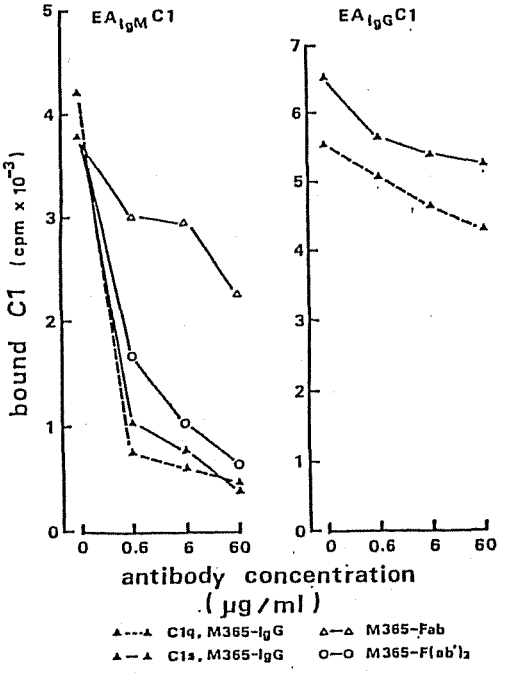


(図 28) M365 による $C\bar{1}$ 遊離の時間的経過

^{125}I 標識C1qを含むEAC1をM365 (60μg/mℓ)あるいは GGVB と30℃で反応させ、時間毎にくみだして遠心し、細胞と上清の放射活性を測定した。縦軸にEAに結合している ^{125}I-C1q の放射活性を示した。

(2) 免疫複合体内の抗体のクラス及び EA 上の抗体濃度の $C\bar{1}$ 遊離現象に及ぼす影響

M365 の影響が免疫複合体内の抗体のクラスによって異なるかどうか検討するために、EAIgM と EAIgG を用いて $C\bar{1}$ 遊離の実験を行った。



(図 29) EAIgGC1 及び EAIgMC1からの $C\bar{1}$ の遊離

^{125}I 標識 EA IgG C1あるいはEAIgMC1と横軸に示した濃度のM365(▲IgG, ○F(ab')$_2$, △Fab)を30℃、30分間反応させた後遠心し細胞と上清の放射活性を測定した。

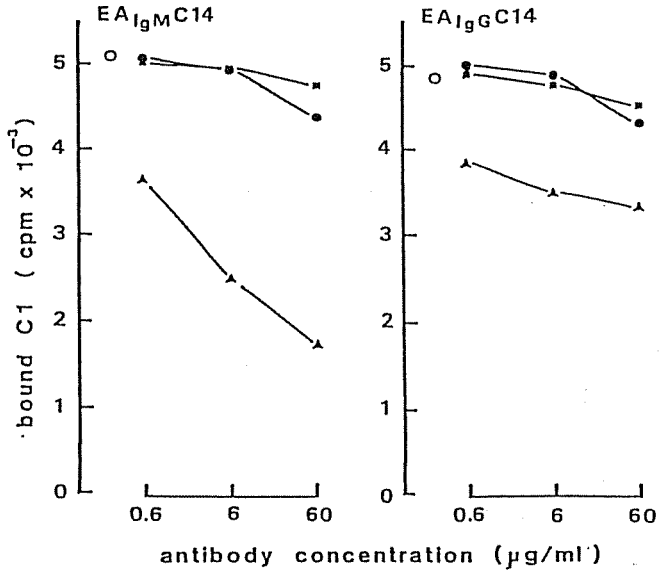
実線, ^{125}I-$C\bar{1}$s の結合量

破線, ^{125}I-C1q の結合量

図 29 に示すように IgG 分子及び $F(ab')_2$ フラグメントは EAIgM に結合している $\overline{C1}$ の 90% 以上を遊離させたが、Fabフラグメントではその効果は減弱した。一方 EAIgG上の $\overline{C1}$ は M365 により殆ど遊離しなかった。また、赤血球上の IgM あるいは IgG 濃度を変量しても M365 による $\overline{C1}$ 遊離の傾向は変わらなかった。 故に EAIgMC1 と EAIgGC1 からのM365 による $\overline{C1}$ 遊離の違いは、細胞上の抗体濃度によるものでなく抗体のクラスの違いにより生じるものと思われた。

(3) EAC14 からの C1 の遊離

M365 による $\overline{C1}$ 遊離が EA 上に C4b が存在している場合影響をうけるか否かを EAC14 を用いて検討した。^{125}I-$\overline{C1}$ を含む EAIgMC14 と EAIgGC14 を作製し、MAb と反応させた(図 30)。



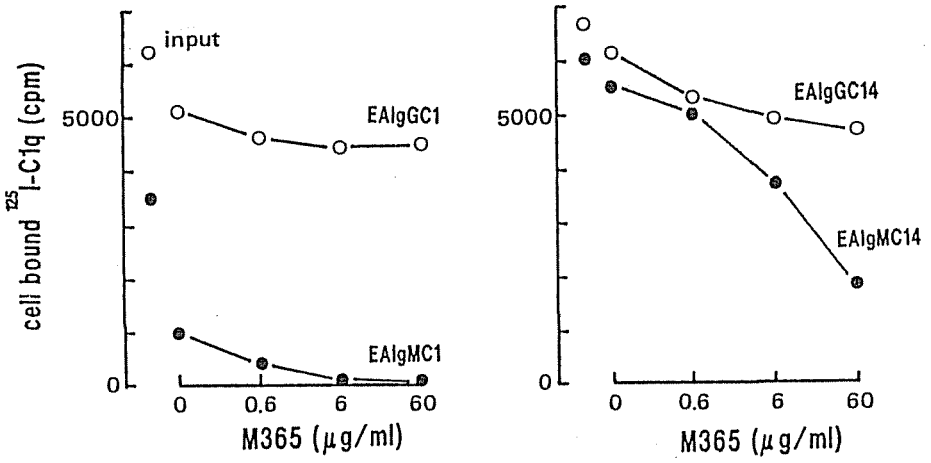
(図 30) EA IgM C14 と EAIgG C14 からの $\overline{C1}$ の遊離

^{125}I 標識 $\overline{C1s}$ を含む EA IgM C14 あるいは EA IgG C14 と MAb (▲ M365, ■ M81, ● M241)を30℃、30分間反応させた後遠心し細胞と上清の放射活性を測定した。縦軸に細胞に結合している^{125}I-$\overline{C1s}$の放射活性を示した。コントロールとしてMAbのかわりにGGVB(○)を用いた。

M365 は EAIgMC14 からも $\overline{C1}$ を遊離させるがその効果は EAIgMC1 に対するよりも弱く 約 30% の $\overline{C1}$ が EA 上に残った。また EAIgGC14 からの $\overline{C1}$ の遊離は少なく、抗体濃度 60μg/ml で約 36% の $\overline{C1}$が EA から遊離されるのみであった。

(4)温度による影響

M365 による $\overline{C1}$ 遊離が温度依存性であるか否かを検討するため、4℃ で (2) 及び (3) と同様の実験を行った。$\overline{C1}$ 遊離の傾向は 4℃ の時も 30℃ の時も同じであった。しかし EAC1 を低イオン強度の GGVB 中 に 4℃ で放置すると $\overline{C1}$ は EAIgMC1 から自発的に遊離し、M365 はそれを促進する傾向にあった(図 31)。EAIgMC14 からは自発的な $\overline{C1}$ の遊離は見られなかった。一方 EAIgGC1 あるいは EAIgGC14 からの 4℃ での $\overline{C1}$ の自発的な遊離は起こらなかった。



(図 31) 4℃ での EAC1 及び EAC14 からの $\overline{C1}$ 遊離

^{125}I-C1qを含むEAIgMC1、EAIgGC1、EAIgGMC14あるいはEAIgGC14と横軸に示した濃度のM365を4℃あるいは30℃で30分間反応させた後遠心し、細胞と上清の放射活性を測定した。縦軸に細胞上の^{125}I-C1qの放射活性を示した。コントロールとしてM365のかわりにGGVBを用いた。

(5) $C\bar{1}$ 遊離における M365 の特異性

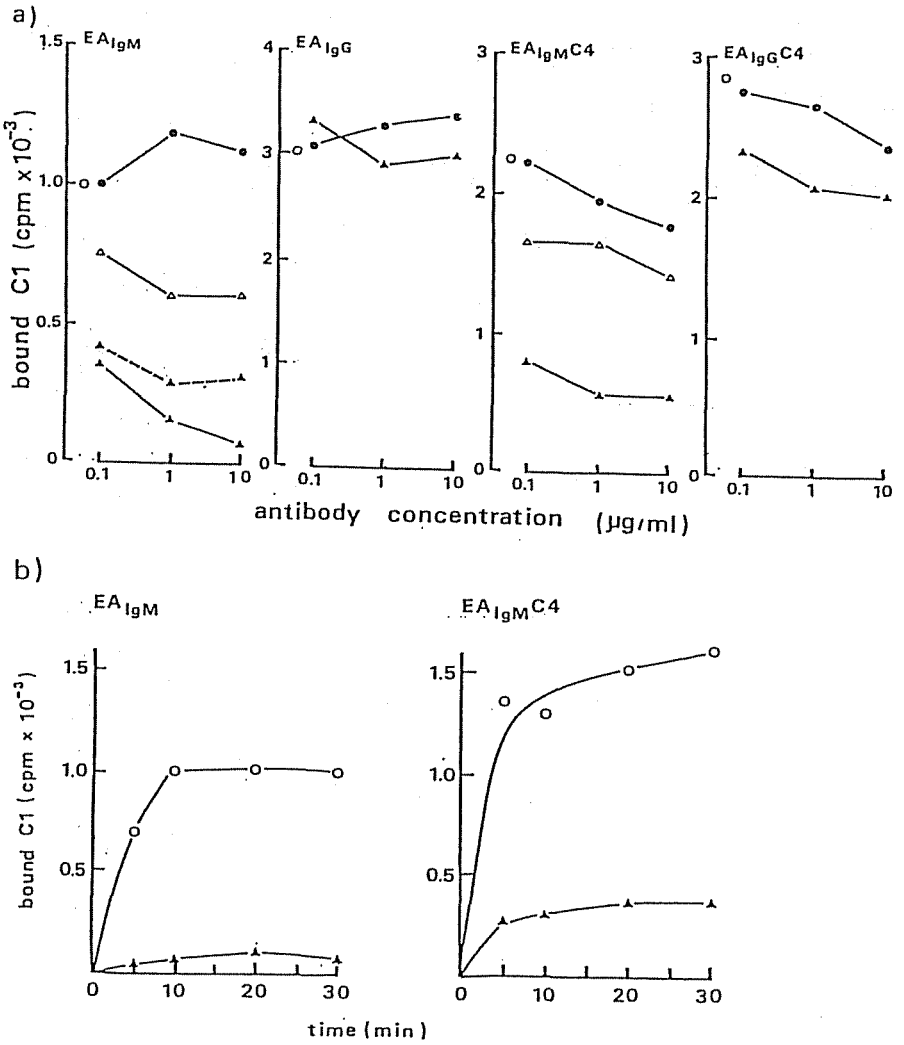
$C\bar{1}$ 遊離が M365 に特異的であるか否かを、M365 とは異なるエピトープを認識する MAb 6 種類を用いて検討した（表 3)。M365 と同じサブクラスで H 鎖を認識する M81 あるいは M20 では $C\bar{1}$ は遊離されず、M365 が認識するエピトープが重要であることが明らかとなった。M365, M81, M20, M36 はいずれも $C\bar{1}s$ のプラスミン分解フラグメント P1-P4 (第二章参照)に反応しうるので、これら MAb は すべて $C\bar{1}s$ のドメインⅣとⅤ内にそのエピトープをもつが、ごく限られた領域に MAb が結合することにより IgM からの $C\bar{1}$ 遊離現象が生じるものと思われる。

表 3　MAb による EAIgMC1 からの $C\bar{1}$ の遊離

MAb	subclass	subunit of $\overline{C1s}$ recognized	cell bound $C\bar{1}$ (cpm)
M 365	γ_1, κ	H chain	202
M 81	γ_1, κ	H	1652
M 20	γ_1, κ	H	1754
M 9	γ_1, κ	L	1503
M 241	γ_2b, κ	L	1407
M 36	γ_2b, κ	H	1457
M 86	γ_2b, κ	L	1588
-			1682

第二節　C1 と免疫複合体の結合に対する M365 の影響

^{125}I-C1s を含む C1 を M365 とあらかじめ反応させた後、EAIgM, EAIgG, EAIgMC4 あるいは EAIgGC4 と反応させ ^{125}I-C1 の結合量をγカウンターで測定した。



(図 32) a) M365による免疫複合体とC1の結合阻害

^{125}I-C1(^{125}I-C1s) 100μlとM365-IgG(▲—▲), M365-F(ab')$_2$(▲--▲), M365-Fab(△—△), M241(●—●)あるいはGGVB(○)100μlを30℃, 30分間反応させた。更に100μlのEAIgM, EAIgG, EAIgMC4, あるいはEAIgGC4を加えて37℃, 30分間反応させ、^{125}I-C1の細胞への結合量を測定した。縦軸に細胞に結合した^{125}I-C1sの放射活性を示した。

b) EAIgMとEAIgMc4へのC1結合の時間的経過

^{125}I-C1sを含むC1と60μg/mlのM365(▲)あるいはGGVB(○)を30℃, 30分間反応させた後、EAIgMあるいはEAIgMC4を反応液へ加え37℃で反応させ、時間毎にくみだして^{125}I-C1の細胞への結合量を測定した。

図 32 a に示すように M365 が結合した C1 は EAIgM には全く結合できないが、EAIgG, EAIgGC4 には結合可能であった。また C4b が多量に結合した EAIgMC4 には 若干量の C1 が結合した。
EAIgM と EAIgMC4 への C1 結合の時間的経過をみると、M365 存在下では C1 の EAIgM への結合は完全に、また EAIgMC4 への結合 は部分的に抑制された(図 32 b)。

第三節　要約ならびに考察

$C\bar{1}s$ に対するモノクローナル抗体である M365 を EAIgMC1 と反応させると $C\bar{1}$ は M365-C1 複合体の形で EA から遊離した。また M365 が結合した C1 は EAIgM に結合不可能であり、MAb のこのような効果は M365 に特異的であった。M365 のエピトープは $C\bar{1}s$ のH 鎖のドメインⅣとⅤ内に存在するが、ドメイン内のある特定の領域に抗体が結合することにより IgM と C1 の結合そのものが不安定となるものと思われる。

その機序として、(1) M365 の認識するエピトープの近傍が $C1r_2$-$C1s_2$ 四量体と C1q の結合に関与しており、M365 が結合することにより C1q のコンフォメーションにゆがみが生じて C1q と IgM 分子との結合が不安定となり、C1-M365 複合体の状態で IgM 分子から離れる。(2) IgM とC1 との結合が C1qと $C\mu4$ ドメインの結合のみでなく他の部分での相互作用も存在することを示唆する報告があるが[45]、C1s の M365 の認識するエピトープ近傍が IgM との相互作用に関与しており、M365 が結合することにより C1-IgM 結合が不安定となり IgM から遊離するの二点が考えられる。

IgG 抗羊赤血球抗体で感作した EA を用いた場合には、M365 は $C\bar{1}$ 遊離を起こさず C1 の EAIgG への結合も阻止しない。このことは細胞上での IgM-C1 結合と IgG-C1 結合の様式が異なっていることを示している。Sandberg らは IgG と IgM への C1 の結合が温度により異なることを報告している[46)47)]。著者の実験においても $C\bar{1}$ は 4℃で EAIgMC1 から自発的に遊離していくが、EAIgGC1 からは遊離せず、IgM と $C\bar{1}$ の結合が低温で不安定になることを示している。しかしながら、低温での EAIgMC1 からの 自発的な $C\bar{1}$ 遊離のメカニズムと M365 による $C\bar{1}$ 遊離のメカニズムが同じか否かは不明である。

また EA 上に C4b が存在している場合、M365 による $C\bar{1}$ の遊離は低下し、C1-M365 複合体の EAIgMC4 への結合も完全には阻止されず、EA 上の C4b 分子と $C\bar{1}$ との間になんらかの相互作用があることを示唆している。Circolo らは、ヒトあるいはウサギの IgM 抗赤血球抗体上には C4b が結合しないと報告しているので[48)]、細胞膜に結合している C4b と $C\bar{1}$ の間に相互作用が生じていると考えられる。

$C\bar{1}s$ の SCRs で構成されているドメインⅣとⅤ内には C4結合部位が存在し、C4b とも弱い親和力で結合することが明らかとなっている[23)]。更に $C\bar{1}r$ も $C\bar{1}s$ と同じ SCRs ドメインを持っており、$C\bar{1}$ と細胞膜上の C4b はこれらのドメインを介して相互作用している可能性があると考えられる。

結論

モノクローナル抗体を用いて補体第一成分の亜成分である $C\bar{1}s$ の機能ドメインの解析を行い以下のような結果を得た。

1) $C\bar{1}s$ の基質である C4 と C2 に対する結合部位は互いに異なり、C4 結合部位は触媒部位と離れた II 鎖上に存在する。

2) $C\bar{1}s$ をプラスミンで限定分解し C4 結合部位を認識する MAb との反応性をみることにより、C4 結合部位が $C\bar{1}s$ のドメインⅣとⅤから構成されているγドメイン内に存在することを示した。

3) $C\bar{1}s$ はドメインⅢとⅤにシアル酸を含む N-linked oligo-saccharide をもつが、ドメインⅤの糖鎖は C4 結合に関与していない。

4) Substrate-blotting 法により $C\bar{1}s$ の SCRs の主なリガンドが C4 であること、また C4b にも弱い親和性をもつことを示した。

5) IgM と C1 の結合を $C\bar{1}s$ の特定のエピトープを認識する MAb が阻止することから、細胞上での IgM と C1 の結合様式と IgG と C1 の結合様式が異なる可能性を示唆した。

謝辞

本研究発表の機会を賜わり、かつ、本論文作成にあたり、終始貴重なる御指導、御助言を賜わりました大阪大学薬学部　富田研一教授に深く感謝いたします。

本論文の作成にあたり、御指導いただきました大阪大学医学部井上公蔵教授に深く感謝いたします。

本研究を行なうにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜わりました NTT 大阪中央健康管理所　副所長　永木和義博士に心から感謝いたします。

本研究に際して、終始多大の激励を賜わり、御指導いただきました大阪府立成人病センター研究所　瀬谷司博士に心から感謝いたします。

モノクローナル抗体作製にあたり、御指導いただきました長崎大学医学部　中山睿一博士ならびに大阪府立成人病センター研究所上中明子氏に深く感謝いたします。

本研究に際して、貴重な御助言をいただきました大阪府立成人病センター研究所　北村肇博士に深く感謝いたします。

本論文の作成にあたり、御協力いただきました伊藤晃子氏に心から感謝いたします。

実験の部

1. 実 験 材 料

(1) 酵素

N-glycanase	Genzyme社
O-glycanase	Genzyme社
endoglycosidase F	Genzyme社
endoglycosidase H	Sigma社
neuraminidase	Sigma社
avidin-peroxidase	Vecter社
papain	Sigma社
pepsin	Sigma社
plasmin	永木博士らにより精製されたもの KabiVitrum社

(2) 基質

TAME	Sigma社
ALME	Aldrich社
ATEE	Aldrich社
AAME	ペプチド研究所
O-phenylenediamine	和光純薬株式会社
4-chloro-1-naphthol	Bio-Rad社

(3) 放射性同位元素

$Na^{125}I$	Amersham社

(4) 樹脂及びカラム担体

Sepharose 6B	Pharmacia社
Sephadex G-200	Pharmacia社
Sephacryl S-200 superfine	Pharmacia社
DEAE Sephadex A-50	Pharmacia社
DEAE Sephacel	Pharmacia社
Q Sepharose	Pharmacia社
DEAE cellulose (DE32)	Whatman社
CM cellulose (CM32)	Whatman社

(5) 試薬

PMSF	Sigma社
p-APMSF	和光純薬株式会社
IAA	和光純薬株式会社
TTHA	Sigma社
BSA	Sigma社
ベンザミジン塩酸	東京化成工業株式会社
biotin succinimide ester	Pierce社
Iodogen	Pierce社
Enzymobeads	Bio-Rad社

(6) 抗体

HRP conjugated goat anti-mouse IgG	Bio-Rad社
IgG 抗羊赤血球抗体	Cordis社
IgM 抗羊赤血球抗体	Cordis社

(7) 細胞培養用試薬・材料

RPMI	Gibco社
Aminopterin	Sigma社
8-Azaguanine	Sigma社
Hypoxanthine	和光純薬株式会社
2′Deoxythymidine	P-L Biochemicals
PEG 4000	石津製薬株式会社
Streptomycin	明治製菓株式会社
Penicillin	明治製菓株式会社
FCS	Cell Culture Laboratories
Dimethylsulfoxide	石津製薬株式会社
Pristane (2,6,10,14-Tetramethylpentadecan)	Sigma社
Freund's complete adjuvant	DIFCO社
Freund's incomplete adjuvant	DIFCO社
96穴　平底プレート	Falcon社
24穴　プレート	Corning社

(8) 動物

マウス BALB/c	静岡実験動物センター
マウス (BALB/c × C57BL/6) F_1	静岡実験動物センター

(9) 機器

分光光度計 (Model 200-10 spectrophotometer)	日立
(Model 200-20 spectrophotometer)	日立
電気伝導度計	ラジオメーター社
ｐＨメーター	ラジオメーター社
限外濾過器	アミコン
γ－カウンター (Aloka ARC-600)	アロカ社
gas-phase protein sequencer (model 470A)	Applied Biosystems
ゲルメンブラン転写装置	マリソル産業
エクトラフォー	LKB
マイクロプレートフォトメーター (MTP-12)	コロナ株式会社

(10) その他

X線フィルム	Eastman Kodak社
ニトロセルロース膜	Bio-Rad社
蛋白用分子量マーカー	Bio-Rad社
ELISA用マイクロプレート	タイターテック社
溶血活性測定用マイクロプレート	住友ベークライト

2. 一般的手法

補体成分の定量

1. 緩衝液

1) ベロナール緩衝液ストック溶液（5VB）

塩化ナトリウム	83.0 g
バルビタールナトリウム	10.19g
1N 塩酸	35.0mℓ

蒸留水を加えて全量を2ℓにした。

2) 0.1M EDTA 溶液（pH7.3）

EDTA 3 ナトリウム	41.22g
1N 塩酸	適量

蒸留水を加えて全量を1ℓにした。

3) メタルストック溶液（0.15M 塩化カルシウム，1M 塩化マグネシウム溶液）

塩化カルシウム（無水）	1.67g
塩化マグネシウム　6 水塩	20.33g

蒸留水を加えて全量を100mℓにした。

4) ゲラチンベロナール緩衝液（GVB）

ゲラチン	1.0 g
5VB	200 mℓ
メタルストック溶液	1.0mℓ

蒸留水を加えて全量を1ℓにした。

5) グルコースゲラチンベロナール緩衝液（GGVB）

ゲラチン	1.0 g
5VB	100 mℓ
グルコース	25.0 g
メタルストック溶液	1.0 mℓ

蒸留水を加えて全量を1ℓにした。

6) 0.01M EDTA ゲラチンベロナール緩衝液（EDTA･GVB）

ゲラチン	1.0 g
5VB	200 mℓ
0.1M EDTA溶液	100 mℓ

蒸留水を加えて全量を1ℓにした。

2．補体成分

1) モルモットC1（C1gp）

Nelson らの方法に従い分離した[49]。

2) モルモットC2（C2gp）

Nelson 法の変法で分離した。

モルモット血清から、中性沈澱でC1を除き、DEAE-、CM-cellulose によるカラムクロマトグラフィーを行なった。

3) ヒトC1（C1hu）

Gigli らの方法に基づき分離した[50]。

4) ヒトC2（C2hu）

ヒト血清から、硫安アンモニウムによる塩析、DEAE-、CM-cellulose によるカラムクロマトグラフィーで分離した。

5) ヒトC4（C4hu）

Bolotin らの方法に基づき、ヒト血清から分離した[51]。

3．感作羊赤血球（EA）

Mayer の方法に従い[52]、羊赤血球（E）の細胞膜をウサギに免疫して抗体を作成した。抗体の至適濃度を決定して、羊赤血球と反応させた。血球数は $5\times10^8/m\ell$ 以上の時には 541nm の吸光度を、$1.5\times10^8/m\ell$ 以下の時には 415nm の吸光度を測定し、あらかじめ実測した血球数と、それを溶血させた時の吸光度から得た標準直線から計算した。

4．intermediate cells

1) EAC1gp cell

EA（$1.5\times10^8/m\ell$）と 300u/mℓ の濃度の C1gp を等量混合し、30℃で15分間反応させて作製した。

2) EAC1gp4hu cell

EAC1gp cell（$1.5\times10^8/m$）と C4hu（300u/cell）を等量混合し、30℃で20分間反応させて作製した。

3) EAC14hu cell

キレート剤 TTHA を用いて Nagaki らの方法により EA とヒトプール血清より作製した[53]。

4) EAC4hu cell

EAC14hu cell を EDTA-GUB 中で37℃で15分間加温することにより C1 を EA から遊離した。

5．溶血活性の測定

1) C4hu

EAC1gp cell(1.5×10^8/mℓ) 0.2mℓ に GGVB で段階希釈したサンプル0.2mℓを加え30℃、20分間反応させる。300u/mℓ の C2gp を 0.2mℓ 加え更に30℃、30分間反応する。その後 C3-C9 として 0.01M EDTA･GVB で50倍希釈したモルモット血清（C-EDTA）2.4mℓ を加えて37℃、60分間反応する。遠心後 415nm の吸光度より溶血率を求め、cell あたりの活性を site 形成数（z）で表現する。

2) C2hu

EAC14hu cell（7.5×10^7/mℓ）0.4mℓ に GGVB で段階希釈したサンプル 0.2mℓ を加え、30℃、4分間反応する。C-EDTA 2.4mℓ を加えて更に37℃、60分間反応させる。

注）マイクロプレートを用いた溶血活性測定の時は、反応液量を 25μℓ とし、C-EDTA のみ 50μℓ とする。

ELISA

《試薬》

0.02M 炭酸緩衝液（pH 9.3）

0.5% BSA-PBS

3% BSA-PBS

0.05% Tween 20-PBS

HRP 結合ヤギ抗マウスIgG

O-フェニレンジアミン

2M H_2SO_4

《基質溶液の調整》

1％（w/v）o-phenylenediamineメタノール溶液	1mℓ
蒸留水	99mℓ
30% H_2O_2	10μℓ

使用直前に混合する

《操作》

1）0.02M 炭酸緩衝液（pH9.3）で10μg/mℓの濃度になるよう調整した $\overline{C1s}$、あるいは C1s 30μℓ をマイクロプレートの各 well に入れ、4℃で一晩放置する。

2）各 well を 0.5% BSA-PBS で 2回洗った後、3% BSA-PBSで well を満たし室温で1時間反応させる。

3）3% BSA-PBS を吸引で除去後、25μℓ の細胞培養上清あるいは精製 MAb を加え室温で1時間反応させる。

4）0.05% Tween 20-PBS で各 well を3回洗う。

5）3% BSA-PBS で適宜希釈した HRP 結合ヤギ抗マウス IgG 25μℓを各 well に加え、室温で1時間反応させる。

6）0.05% Tween 20-PBS で4回洗う。

7）基質溶液 25μℓ を加え、遮光して室温で30分間反応させる。

8）2M H_2SO_4 25μℓ を加えて反応を停止させた後マイクロプレートフォトメーターで492nmの吸光度を測定する。

モノクローナル抗体及びそのフラグメントの精製

1．IgGの精製

1）硫安塩析

0℃で飽和にした硫酸アンモニウムをマウス腹水に加え、最終飽和度45%として0℃、30分間析出させた。析出した沈澱を45%飽和硫酸アンモニウムで1回洗い、0.02M NaClを含む0.02M Tris-HCl緩衝液（pH8.0)に透析した。

2）DEAE-Sephacel　カラムクロマトグラフィー

0.02M Tris-HCl、0.02M NaCl（pH8.0, イオン強度0.03）緩衝液で平衡化したカラムにサンプルを添加し、同じ緩衝液でカラムをよく洗った後、0.35M NaClを含む Tris-HCl緩衝液とで塩濃度勾配で溶出した。各フラクションを還元条件下で SDS-PAGE（10%）を行い、IgG を含むフラクションのみをプールした。

2．Fabフラグメントの精製[54]

1）パパイン消化

0.01M システイン、2mM EDTA、0.075M NaClを含む0.075M リン酸緩衝液（pH7.0）にて透析した IgG に同緩衝液で 1mg/mℓ の濃度に溶解したパパインを重量比で 3% となるよう加えて37℃、6時間インキュベートした。

2）Sephacryl S-200 superfine によるゲル濾過を行った。

3）0.01MPB（pH8.0）で平衡化した DE 32カラムに添加し、非吸着画分をプールした。

3．$F(ab')_2$ フラグメントの精製[55]

IgG を70分の1重量のペプシンで 0.1M クエン酸緩衝液中（pH3.5）で37℃、8時間消化した。2M Tris-HCl 緩衝液（pH8.6）を加えて pH を中性にして反応をとめ、Sephacryl S-200によるゲル濾過を行った。

蛋白質のゲル電気泳動

1. SDS-PAGE

《試薬》

R1	アクリルアミド	30.0g
	N,N'-メチレンビスアクリルアミド	0.8g
	蒸留水を加えて全量を100mlにした。	
R2	Tris base	18.15g
	1N 塩酸	31.0ml
	TEMED	0.23ml
	蒸留水を加えて全量を100mlにした。	
*R2	Tris base	5.98g
	1N 塩酸	48.0ml
	TEMED	0.23ml
	蒸留水を加えて全量を100mlにした。	
R3	過硫酸ナトリウム	0.3g
	蒸留水を加えて全量を100mlにした。	

泳動用緩衝液

[25mM Tris base-192mM グリシン-0.1% SDS]

Tris base	3.0g
グリシン	14.4g
10% (W/V) SDS	10ml

蒸留水を加えて全量を1lにした。

サンプル緩衝液（2 x 濃度）

[62.5mM Tris-HCl(pH6.8)-2%(W/V) SDS-10%(V/V)

グリセロール-0.01%(W/V) ブロムフェノールブルー]

サンプルを還元する時は上記緩衝液に 2ME を10%となるよう加えた。

染色液

PAGE-ブルー（第一化学薬品株式会社）

シルバーステインキット（Bio-Rad社）

脱色液

25% メタノール-8% 酢酸

分離用ゲル溶液

R1、R2、R3、10%(w/v)SDS、蒸留水を一定の割合で混合して、7.5%あるいは10%アクリルアミド、375mM Tris-HCl(pH8.8)、0.1% SDS溶液を調整した。

濃縮用ゲル溶液

R1、*R2、R3、10%(W/V)SDS、蒸留水を用いて 3% アクリルアミド、125mM Tris-HCl(pH6.8)、0.1% SDS溶液を調整した。

泳動条件

100V 定電圧

色素マーカーがゲルの下端にくるまで泳動。

Immuno-blotting

《試薬》

0.5% NP40-PBS

0.05% Tween 20-PBS

3% BSA-PB

4-クロロー1-ナフトール

30% H_2O_2

0.02 M Tris-HCl, 0.5M NaCl(pH 7.5)

《転写用緩衝液》

Tris-base	3.0g
グリシン	14.4g
メタノール	200mℓ

蒸留水を加えて全量を1ℓにした。

《転写条件》

42-45V　2時間

《操作》

1) SDS-PAGE で分離された蛋白のニトロセルロース膜への転写は Towbin の方法に従い行った。蛋白が転写されたニトロセルロース膜は残留 SDS を洗浄するため 0.5% NP40-PBS 中で4℃、一晩インキュベートした。

2) 0.05% Tween 20-PBS で5分間づつ3回洗浄後、3% BSA-PB中で37℃で1時間反応させ非特異的結合を防いだ。

3) 0.05% Tween 20-PBS で5分間ずつ3回洗浄。

4) 3% BSA-PBで 1μg/mℓ 前後に調整したモノクローナル抗体、あるいは培養上清そのものをニトロセルロース膜にマウントし、37℃で1時間インキュベートした。

5) 0.05% Tween 20-PBS で10分間ずつ3回洗浄。

6) 3%BSA-PB で希釈した HRP 結合抗マウス IgG 抗体をニトロセルロース膜にマウントし37℃、1時間インキュベートした。

7) 0.05% Tween 20-PBS で10分間ずつ4回洗浄。

8) 4-クロロ-1-ナフトールを 3mg/ml の濃度になるよう冷メタノール 5ml に溶解し、30% H_2O_2 15μlを含む 0.02M トリス緩衝液(pH 7.5) 25ml と使用前に混合し、発色液として用いた。

蛋白質の^{125}I標識

1) ヨードゲン法

100μg/mlの濃度になるようヨードゲンをジクロロメタンに溶解し、1.5ml のプラスチックチューブに 500μlずつ分注し、1昼夜ドラフト内で放置し乾固させた。このチューブに蛋白質溶液 400μlと $Na^{125}I$ 50μCiを加え、室温で時々撹拌しながら20分間反応させた。反応後 12,000gで10分間遠心し、上清に KI を加えて反応を停止し透析を行った。

2) Enzymobeads 法

失活しやすい蛋白質の場合には、Bio-Rad 社の Enzymobeads を用いマニュアルに従って標識し、PD-10カラムにより未反応の^{125}Iを取り除いた。

蛋白質のビオチン標識

0.1M $NaHCO_3$ にて透析したモノクローナル抗体及び C11NA(1mg/ml) 1mlに、biotin succinimide ester (1mg/ml DMSO) 60μlを加えた。室温で4時間よく混合しながら反応させた後 PBS (pH7.4) にて透析した[56]。

3．第一章の実験

$\overline{C1s}$ の精製

1) オイグロブリン分画

新鮮ヒト血清1容量(4℃)に 5㎜M $CaCl_2$を含む蒸留水4容量(4℃)を加え、pHを7.4に調整し、低温室で2時間撹拌した後10,000gで20分間遠心した。沈澱を5mM $CaCl_2$を含む 0.3M Tris-HCl 緩衝液(pH8.0)で一度洗った後0.5M NaCl、5mM $CaCl_2$を含む 0.01M Tris-HCl 緩衝液(pH8.0)に溶解した。

2) Sepharose 6Bによるゲル濾過

0.5M NaCl、5mM $CaCl_2$を含む 0.01M Tris-HCl 緩衝液(pH8.0)で平衡化した Sepharose 6Bカラム (5×86㎝)にサンプルを添加した。$\overline{C1}$の溶血活性を示すフラクションをプールし分子量2万カットの膜 (UP-20 東洋濾紙)を用いて限外濾過法で濃縮し、0.01M EDTA、0.15M NaCl を含む 0.01M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.8, 9.2ms/㎝)にて透析した。

3) DEAE-Sephadex A-50 イオン交換クロマトグラフィー

上記緩衝液で平衡化したカラム (2×22㎝) に添加し、同じ緩衝液でカラムをよく洗浄した後 0.4M NaCl を含む緩衝液との間で塩濃度勾配で溶出した。$\overline{C1s}$はイオン強度0.29～0.31で溶出され、その部分をプールし濃縮した。

4) Sephadex G-200によるゲル濾過

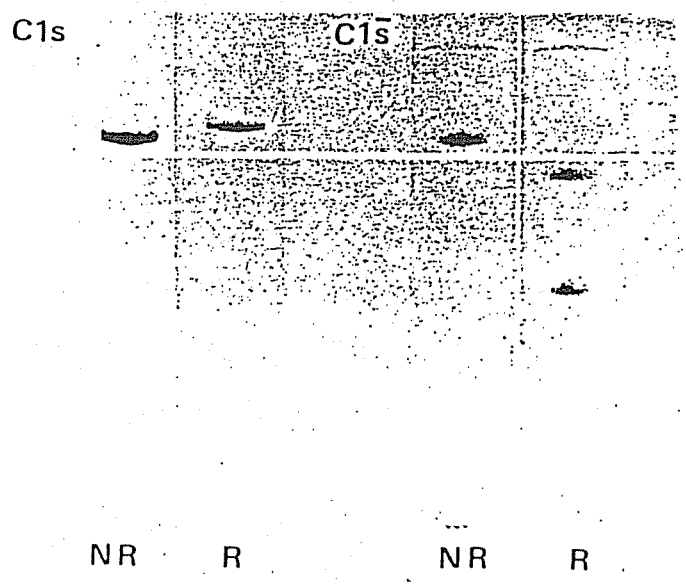
0.5M NaCl、0.01M EDTAを含む 0.01M リン酸緩衝液 (pH7.4) で平衡化したカラムで最終の精製を行なった。$\overline{C1s}$ の活性を示すフラクションをプールし、濃縮後 SDS-PAGE を行ない単一の蛋白質であることを確認した。

C1sの精製

1) PEG 沈澱

新鮮血清に$CaCl_2$、benzamidine、PMSF を各々 5mM, 10mM, 1mM となるように加え2℃にまで冷却し、PEG 4000を最終濃度 5%(W/V)となるように加えて低温で30分間撹拌した。10,000gで20分間遠心後、沈澱を5%PEG、0.15M NaCl、5mM $CaCl_2$、10mM benzamidine、1mM PMSFを含む0.01M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4)で洗い、DEAE-Sephadex カラムの平衡化緩衝液に溶かした。これ以後の精製は $\overline{C1s}$精製と同様の方法で行なった。ただし、緩衝液には10mM benzamidine と1mM PMSF を加えた。

精製 $\overline{C1s}$ 及び C1s の SDS-PAGE を図 32 に示す。



(図 32)
$\overline{C1s}$, C1s の 還元(R)、非還元(NR)条件下でのSDS-PAGE (9% gel)

C1INAの精製

C1INAの精製は Salvesenらの方法に基づいて行ったが[57]、すべての精製段階の緩衝液に 5mM benzamidine と 0.2mM p-APMSF を加え、最後の精製段階として Sephacryl S-200 Superfine によるゲル濾過を付け加えた。

モノクローナル抗体の作製

$\overline{C1s}$に対するモノクローナル抗体は Köhler と Millstein[13] の方法に準じて作製した。精製ヒト$\overline{C1s}$を (BALB/c × C57BL6)F_1 マウスに2週間間隔で4回免疫し最終免疫から3日後の脾細胞を BALB/c由来のミエローマ細胞 NS-1 cellと細胞数 5:1 の割合でポリエチレングリコール法により融合した。培養細胞上清中の抗体活性は ELISA法でスクリーニングし、陽性クローンのみを選んだ後、更に$\overline{C1s}$によるC4、C2 分解活性を阻止するクローンをマイクロプレートによる溶血反応の阻止で選択した。陽性クローンはサブクローニングし、得られた細胞をプリスタンをあらかじめ注射し 400~500 radのx線を照射したマウスの腹腔内に注射して腹水を採取した。

MAbによる$\overline{C1s}$のエステラーゼ活性阻害の測定

0.14M NaCl、0.01%BSA を含む 0.1M Tris-HCl緩衝液 (pH 7.4) 0.5mℓ中で$\overline{C1s}$ 1.5μg と変量した MAb あるいはその Fab フラグメントを37℃、30分引き続いて4℃一晩反応させた。

基質として、AAME (10mM) あるいは ALME (10mM) を0.5mℓずつ反応液中に加え、30℃、1時間反応させた。ATEE (5mM) あるいは TAME (10mM) を基質として用いる時は、30℃、2時間反応させた。$\overline{C1s}$によって加水分解された基質量は Roberts の方法に従って定量した[15]。

$\overline{C1s}$ のエステラーゼ活性は次式で与えられる。

$$\frac{OD_{500}(\text{buffer + substrate}) - OD_{500}(\overline{C1s} + \text{substrate + antibody})}{OD_{500}(\text{buffer + substrate}) - OD_{500}(\overline{C1s} + \text{substrate})} \times 100$$

4．第二章の実験

二次元 SDS-PAGE[58)]

0.06M NaCl を含む 0.02M Tris-HCl 緩衝液中で $\overline{C1s}$（1㎎/㎖）とプラスミンを S/E 比 20(w/w)で 37℃、2時間反応させ、非還元条件下で10%の円筒状SDS-ポリアクリルアミドゲル(直径2㎜)に添加した。泳動後ゲルは 5% 2-ME を含むサンプル緩衝液中で室温30分間放置した後、16㎝x16㎝x2㎜ の 10% SDS-スラブポリアクリルアミドゲル上にのせ１%アガロースで固めてから泳動した。

$\overline{C1s}$ 及び $\overline{C1s}$ のプラスミン分解フラグメントの糖鎖除去

$\overline{C1s}$をヨードゲン法にて^{125}I標識（3.07 x 10^5cpm/μg）した後、0.06M NaCl を含む 0.02M Tris-HCl 緩衝液（pH7.4）中でプラスミンと S/E 比20（w/w）で37℃で反応させた。2時間後 p-APMSF、IAA、EDTAを各々 0.2mM、25mM、10mM となる様加えて反応を停止させ、20mM Tris-マロン酸緩衝液(pH 7.0)にて一晩透析した。

約18μgのサンプルを0.24UのN-glycanaseと37℃16時間、あるいは0.03Uのneuraminidaseと37℃1時間反応させた。またあるサンプルは neuraminidase 処理を行なってから、0.24Uの N-glycanaseあるいは3mUの O-glycanaseと37℃、16時間反応させた。O-glycanase 処理の場合には、上記緩衝液に 1mM 酢酸カルシウムと 10mM D-galactono-γ-lactoneを加えた。

Endoglycosidase H 消化は、0.1% NP40を含む0.05M 酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.5）中で37℃、6時間行った後、更に endoglycosidase H を加えて37℃、16時間行った。Endoglycosidase F 消化は 0.05M EDTA、0.1% NP40、0.1% SDS、1% 2-ME を含む 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液（pH6.1）

中で37℃、16時間行った。

上記サンプルは 16cmx16cm のサイズの SDS-スラブゲルに添加し、オートラジオグラムで解析した。

substrate-blotting

1) C9の精製

Biesecker らの方法に基づき精製した[59]。

2) C4bの精製

C4 精製時の粗画分より Q-Sepharose カラムを用いて分離した。

3) C4及びC4bの^{125}I標識

ヨードゲン法にて行った。^{125}I-C4 の溶血活性は未標識 C4 活性の84%であった。

4) substrate blotting

$\overline{C1s}$、$\overline{C1s}$のプラスミン分解フラグメント、及び C9 を非還元条件下で 10% SDS-PAGE で分離し、ニトロセルロース膜に転写した後、膜を 3% BSA-PB 中で37℃、1時間加温した。ニトロセルロース膜をカットし、各々へ ^{125}I-C4 (6.62μg/mℓ、1.8 x 10^6cpm) あるいは ^{125}I-C4b (20.4μg/mℓ、1.85 x 10^6cpm) を加えて室温で90分間反応させた。緩衝液は 70mM NaCl、2.5% dextrose、0.5% BSAを含む 5mM PB (pH7.4) を用いた。

ニトロセルロース膜上の $\overline{C1s}$ の活性を不活化したい時は 0.5mM p-APMSF でニトロセルロース膜を前処理した。またモノクローナル抗体による阻害実験の場合は ^{125}I-C4と反応させる前にモノクローナル抗体と室温で30分間反応させた。

更に、未標識 C4、C4b による拮抗実験の場合には、^{125}I標識C4、C4bを同時存在下にニトロセルロース膜と反応させた。ニトロセルロース膜と反応し

た C4 は SDS-PAGE (7.5%) 後オートラジオグラムで解析し、ニトロセルロース膜は 0.05% Tween 20を含む上記緩衝液で10分間ずつ2回洗った後オートラジオグラムで解析した。

26k-HFの精製及びN末端アミノ酸分析

1) 抗体カラムの作製

約60㎎の M81をブロムシアンで活性化した Sepharose 4Bに結合させた。

2) 26k-HFの精製

新鮮ヒト血清500㎖より M81 結合 Sepharoseカラムを用いて約30㎎の$\overline{C1s}$を精製した。精製 $\overline{C1s}$を S/E比 20(w/w)の割合でプラスミンと37℃、2時間反応させ、PMSF をO.5mMとなるよう加えて反応を停止させた。

上記サンプルを調整用 SDS-PAGE (10%) にて分離し、$\overline{C1s}$のP1フラグメントをエクストラフォーにより電気的にゲルから回収した。得られた P1フラグメントを引き続き2% 2ME と 50mM IAA で処理し、再度 SDS-PAGE (10%) に添加し、26kフラグメントを電気的にゲルから抽出した。回収した蛋白質は 0.05M 炭酸水素アンモニウム (pH7.5) に対して透析し、凍結乾燥後アミノ酸配列分析装置により N末端アミノ酸の分析を行った。

5. 第三章の実験

C1qの精製

Tennerらの方法に従い新鮮ヒト血清より分離した[60]。

C1rの精製

C1s精製途中の DEAE Sephadexカラムクロマトグラフィーの段階で、C1rはC1sよりも低いイオン強度で溶出される。抗 C1r抗体との counter-immuno-precipitationで C1rの抗原性を検出し、C1rを含むフラクションをプールし、更に Sephadex G-200によるゲル濾過を行い精製した。

^{125}I-C1の再構成

C1q と C1sは Enzymobeads法で ^{125}I 標識した。

^{125}I-C1q(32$\mu g/m\ell$)、C1r(20$\mu g/m\ell$) 及び C1s(20$\mu g/m\ell$) あるいは、C1q(42$\mu g/m\ell$)、C1r(25$\mu g/m\ell$) 及び ^{125}I-C1s(22$\mu g/m\ell$) を1.5mM Ca^{2+}、0.6mM Mg^{2+}、0.7% ovalbumin の存在下で総量 0.1$m\ell$のトリス塩酸緩衝液 (pH7.5、イオン強度 0.14) 中で5℃、10分間混合して再構成した。

MAbによるcellからの^{125}I-$\overline{C1}$の遊離

EAIgG C1 あるいは EAIgM C1 は^{125}I-C1 と EAIgG あるいは EAIgMを37℃、30分間反応させ、GGVB で3回洗浄して作製した。

EAIgM C14 あるいは EAIgG C14 は、^{125}I-C1sを含む少量の^{125}I-C1と未標識 C1の混合物 (300U/$m\ell$) とC4 (300U/$m\ell$) を EAIgM あるいは EAIgGへ順次結合させ作製した。これらの cell (1.5X10^8/$m\ell$、0.15$m\ell$)と種々の濃度の MAb (0.15$m\ell$) を30℃、30分間反応させ、GGVB で2回洗った後、cellと

上清の放射活性をγカウンターで測定した。

^{125}I-C1のcellへの結合

100μℓの ^{125}I-C1（7000cpmの^{125}I-C1sを含む）と100μℓの MAb あるいはそのフラグメントを30℃、30分間反応させた後、3X10^{6}/mℓ の濃度のcell 100μℓを加えて更に37℃、30分間加温した。

反応混合液から50μℓずつとり、dibutyl phthalateとdinonyl phthalateの混合物 300μℓ のはいっているポリエチレンチューブ4本にそれぞれ重層し、7200gで90秒間遠心した。チューブは cell pellets のすぐ上で切断し、cellと上清の放射活性をγ-カウンターで測定した。

^{125}I-C1の Eへの非特異的結合は各値からEへの結合値を差し引くことで消去した。

引用文献

1) Johnson, A.R., Hugli, T.E. and Müller-Eberhard, H.J. (1975) Immunology 28:1067.

2) Gorski, J.P., Hugli, T.E. and Müller-Eberhard, H.J. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. 76:5299.

3) Hugli, T.E. and Müller-Eberhard, H.J. (1978) Advanc. Immunol. 26:1.

4) Strang, C.J., Cholin, S., Spragg, J., Davis, A.E., Schneeberger, E.E., Donaldson, V.H. and Rosen, F.S. (1988) J. Exp. Med. 168:1685.

5) Arlaud, G.J., Colomb, M.G. and Gagnon, J. (1987) Immunol. Today 8:106.

6) Reid, K.B.M. and Porter, R.R. (1976) Biochem. J. 155:19.

7) Reid, K.B.M., Sim, R.B. and Faiers,A.P. (1977) Biochem. J. 161:239.

8) Strang, C.J., Siegel, R.C., Phillips, M.L., Poon, P.H. and Schumaker, V.N. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79:586.

9) Perkins, S.J., Villiers, C.L., Arlaud, G.J., Boyd, J., Burton, D.R., Colomb,M.G. and Dwek, R.A. (1984) J. Molec. Biol. 179:547.

10) Matsumoto, M. and Nagaki, K. (1986) J.Immunol. 137:2907.

11) Sim, R.B., Porter, R.R., Reid, K.B.M. and Gigli, I. (1977) Biochem. J. 163:219.

12) Carter, P.E., Dunber, B. and Fothergill, J.E. (1983) Biochem. J. 215:565.

13) Köhler, G. and Milstein, C. (1975) Nature 256:495

14) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 76:4350.

15) Roberts, P.S. (1985) J. Biol. Chem. 232:285.

16) Nagaki, K., Iida, K. and Inai, S. (1974) Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 46:935.

17) Harpel, P.C. and Cooper, N.R. (1975) J. Clin. Invest. 55:593.

18) Chesne, S., Villiers, C.L., Arlaud, G.J., Lacroix, M.B., and Colomb, M.G. (1982) Biochem. J. 201:61.

19) Villiers, C.L., Arlaud, G.J., and Colomb, M.G. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 82:4477.

20) Strunk, R. and Colten, H.R. (1974) J. Immunol. 112:905.

21) Kondo, M., Gigli, I. and Austen, F.K. (1972) Immunology 22:305.

22) Takahashi, K., Nagasawa, S. and Koyama, J. (1980) Biochem. Biophys. Acta. 611:196.

23) Matsumoto, M., Nagaki, K., Kitamura, H., Kuramitsu,S., Nagasawa, S. and Seya, T. (1989) J. Immunol. 142:2743.

24) MacKinnon, C.M., Carteo, P.E., Smyth, S.J., Dunber, B. and Fothergill, J.E. (1987) Eur. J. Biochem. 169:547.

25) Tosi, M., Puponchel, C., Meo,T. and Julier, C. (1987) Biochemistry 26:8516.

26) Mole, J.E., Anderson, J.K., Davison, E.A. and Woods, D.E. (1984) J.Biol.Chem. 259:3407.

27) Bentley, D.R. and Porter, R.R. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81:1212.

28) Kristensen, T., Wetsel, R.A. and Tack, B.F. (1986) J.Immunol. 136:3407.

29) Chung, L.P., Bentley, D.R. and Reid, K.B.M. (1985) Biochem.J. 230:133.

30) Caras, I.W., Davitz, M.A., Rhee, L.,Weddell, G., Martin, D.W. and Nussenzweig, V. (1987) Nature 325:545.

31) Klickstein, L.B., Wong, W.W., Smith, J.A., Weise, J.H., Wilson, J.G. and Fearon, D.T. (1987) J.Exp.Med. 165:1095.

32) Weise, J.J., Toothaker, L.E., Smith, J.A., Weise, J.H. and Fearon, D.T. (1988) J. Exp. Med. 167:1047.

33) Lublin, D., Liszewski, K., Post, T., Arce, M., Le Beau, M., Rebentisch, M., Lemons, R., Seya, T. and Atkinson, J.P. (1988) J. Exp. Med. 168:181.

34) Okada, J., Takahashi, K., Nagasawa, S. and Koyama, J. (1987) J. Biochem. 102:939.

35) Nagaki, K., Hashimoto, C. and Inai, S. (1976) Int. Archs allergy appl. Immun. 50:1.

36) Matsumoto, M., Nagaki, K., Seya, T. and Kitamura, H. (1989) Molec. Immun. 26:697.

37) Schumaker, V.N., Zavodszky, P. and Poon, P.H. (1987) Ann. Rev. Immunol. 5:21.

38) Ellerson, J.R., Yasmeen, D., Painter, R.H. and Darrington, K.J. (1972) FEBS Letter 24:318.

39) Colomb, M. and Porter, R.R. (1975) Biochem. J. 145:177

40) Burton, D.R., Boyd,J., Brampton, A.D., Easterbrook-Smith, S.B., Emanuel, D.J., Novotny, J., Rademacher, T.W., van Scharavendijk, M.T., Sternbery, M.J.E. and Dwek, R.A. (1980) Nature 288:338.

41) Hurst, M.M., Volanakis, J.E., Hester,R.B., Stroud, R.M. and Bennett, J.C. (1974) J. Exp. Med. 140:1117.

42) Hurst, M.M., Volnakis, J.E., Stroud, R.M. and Benett, J.C. (1975) J. Exp. Med. 142:1322.

43) Okada, M., Udaka, K. and Utsumi, S. (1985) Molec.Immun. 22:1399.

44) Ziccardi, R.J. (1986) J. Immun. 136:3378.

45) Siegel, R.C. and Cathou, R.E. (1980) J. Immun. 125:1910.

46) Sandberg, A.L. and Stollar, B.D. (1966) J. Immun. 96:764.

47) Cunniff, R.V. and Stollar, B.D. (1968) J. Immun. 100:7.

48) Circolo, A. and Borsos, T. (1982) J. Immun. 129:1485.

49) Nelson, R.A., Jensen, J., Gigli, I. and Tamura, N. (1966) Immunochemistry 3:111.

50) Gigli, I., Porter, R.R., and Sim, R.B. (1976) Biochem. J. 157:541.

51) Bolotin, C., Morris, S., Tack, B. and Prahl, J. (1977) Biochemistry 16:2008.

52) Mayer, M.M. (1961) Experimental Immunochemistry, Second Edition p.133.

53) Nagaki, K., Iida, K., and Inai, S. (1974) J. Immunol. Methods 5:307.

54) Buchegger, F., Haskell, C.M., Schreyer, M., Scazziga, B.R., Randin, S., Carrel, S. and Mach, J. (1983) J. Exp. Med. 158:413.

55) Parham, P. (1983) J. Immun. 131:2895.

56) Goding, J.W. (1980) J. Immnol. Methods 39:285.

57) Salvesen, G.S., Catanese, J.J., Kress, L.F. and Travis, J. (1985) J. Biol. Chem. 260:2432.

58) Allison, J.P., Mcintyre, B.W. and Bloch, D. (1982) J. Immunol. 129:2293.

59) Biesecker, G. and Müller-Eberhard, H.J. (1980) J. Immunol. 124:1291.

60) Tenner, A.J., Lesavre, P.H. and Cooper, N.R. (1981) J. Immunol. 127:648.